



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Análisis de la fracción alcaloidal y evaluación
toxicológica de *Solanum tuberosum* L. “tocosh de
papa” a nivel preclínico**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Toxicología

AUTOR

Jonas Roberto VELASCO CHONG

ASESOR

Mg. Oscar HERRERA CALDERÓN

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Velasco J. Análisis de la fracción alcaloidal y evaluación toxicológica de *Solanum tuberosum* L. “tocosh de papa” a nivel preclínico [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2021.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	0000-0003-2751-8558
DNI o pasaporte del autor	46985963
Código ORCID del asesor	0000-0001-7264-0961
DNI o pasaporte del asesor	44789288
Grupo de investigación	“__”
Agencia financiadora	“__”
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	<p>Facultad de Medicina Humana – UNMSM: 12°03'26.9"S 77°01'22.5"W -12.057474, -77.022917</p> <p>Facultad de Farmacia y bioquímica – UNMSM: 12°03'20.1"S 77°01'24.7"W -12.055576, -77.023535</p> <p>Centro Poblado de Chicchuy – Recolección de Muestra vegetal: 10°00'13.0"S 76°12'17.0"W -10.003611, -76.204722</p>
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019-2020
Disciplinas OCDE	<p>Toxicología</p> <p>http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07</p>



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado



ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN TOXICOLOGÍA

Siendo las **18:00 hrs. del 20 de enero de 2021** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de tesis, presidido por el Dr. César Augusto Canales Martínez e integrado por los siguientes miembros: Mg. Oscar Herrera Calderón (asesor), Dr. José Luis Rodríguez Gutiérrez y Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN ALCALOIDAL Y EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE *Solanum tuberosum* L. "TUCOSH DE PAPA" A NIVEL PRECLÍNICO"**, presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica **JONAS ROBERTO VELASCO CHONG**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Toxicología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

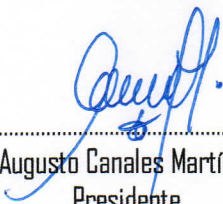
A continuación, el Jurado Evaluador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

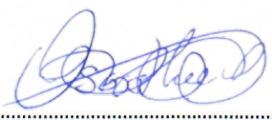
Dieciocho (18) - Muy Bueno

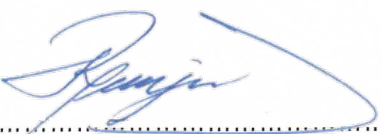
Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Farmacia y Bioquímica **JONAS ROBERTO VELASCO CHONG**, el Grado Académico de Magíster en **Toxicología**.

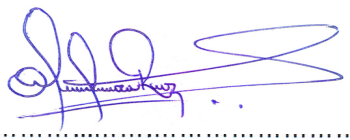
Siendo las **20** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **20** hrs. del 20 de enero de 2021.


.....
Dr. César Augusto Canales Martínez (P.Asoc. T.P.)
Presidente


.....
Mg. Oscar Herrera Calderón (P. Aux., T.C.)
Miembro - Asesor


.....
Dr. José Luis Rodríguez Gutiérrez (P. Asoc. D.E.)
Miembro


.....
Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz (P. Asoc. T.P.)
Miembro

Observaciones:

.....

DEDICATORIA

A nuestro señor Dios, por darme la oportunidad de estar vivo y bendecirme en todo momento, por darme fortalecimiento y sabiduría y por haber puesto en mi camino a aquellos magníficos seres humanos que han sido mi soporte y me ayudaron durante todo el periodo de estudio y labor.

A mis Abuelos que están en el Cielo Jonás y María, por guiarme en todo momento. A mi padre Rolando y a mi madre Floedecit que los amo mucho, que me educaron desde niño para ser hombre de bien.

A mi Esposa Nansi Marsela y a mis hijos Jonas Francisco y Luz Camila por ser mi motor en mi vida, y estar siempre a mi lado.

A mis hermanos Carlos Rolando y Roger Orlando, por ser como mis amigos y estar conmigo en los buenos y malos momentos para sobrellevar las cosas.

AGRADECIMIENTOS

A mi maestro y asesor de tesis, Mg. Oscar Herrera Calderón que, en todo en este proceso y labor, me apoyo con sus experiencias y conocimientos para poder culminar este trabajo, dedicando todo su tiempo que muchas veces le faltaba.

Al Dr. Américo Castro Luna, para sus enseñanzas, experiencias y orientaciones en los primeros indicios de la ejecución de la presente tesis.

Al Sr. Madrid, responsable técnico del laboratorio de la Facultad de Medicina Humana, por su apoyo y colaboración en la parte experimental de la ejecución de la Tesis.

Al Dr. Cristhian Aguilar Carranza. Médico Anatomopatólogo, por su contribución en el desarrollo experimental de la Tesis, correspondiente a los aspectos de su especialidad.

ÍNDICE

RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo general	3
1.1.2 Objetivos específicos	3
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	4
2.1 Antecedentes	4
2.1.1 Antecedentes a nivel internacional	4
2.1.2 Antecedentes a nivel nacional	6
2.1.3 Antecedentes a nivel local	7
2.2 Aspectos teóricos	9
2.2.1 El <i>tocosh</i> de “papa”	9
2.2.2 Principios activos	9
2.2.3 Estudio fitoquímico	10
2.2.4 Características del <i>tocosh</i> de “papa”	10
2.2.5 Usos medicinales del <i>tocosh</i> de “papa”	10
2.2.6 Preparación del <i>tocosh</i> de “papa” (<i>Solanum tuberosum</i> L)	11
2.2.7 Cultivo de la “papa” (<i>Solanum tuberosum</i> L)	12
2.2.8 Descripción botánica (<i>Solanum tuberosum</i> L)	12
2.2.9 Clasificación taxonómica de la “papa” (<i>Solanum tuberosum</i> L)	13

2.2.10 Condiciones climáticas (<i>Solanum tuberosum</i> L)	14
2.2.11 Importancia de la “papa” (<i>Solanum tuberosum</i> L)	14
2.2.12 Evaluaciones toxicológicas	15
2.2.12.1 OECD N° 407: Toxicidad oral a dosis repetida por 28 días	15
2.2.12.2 OECD N° 420: Toxicidad aguda oral - procedimiento de dosis fija	17
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	18
3.1 Tipo y diseño de investigación	18
3.2 Población de estudio	18
3.2.1 Recolección de material de trabajo	18
3.2.2 Obtención de los animales de experimentación	18
3.3 Tamaño de muestra	19
3.3.1 Preparación y tratamiento del <i>tocosh</i> para su conversión en harina	19
3.3.2 Especie animal	19
3.4 Técnicas de recolección de datos	20
3.4.1 Análisis cualitativo (<i>screening</i> fitoquímico preliminar)	20
3.4.2 Determinación de alcaloides por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)	22
3.4.3. Evaluación de estudio de toxicidades orales en animales de experimentación	24
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	26
4.1 Análisis fitoquímico	26
4.2 Determinación de alcaloides por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)	27

4.3 Evaluación de estudio de toxicidades orales en animales de experimentación	30
4.3.1 Toxicidad oral: Estudio de dosis repetida por 28 días en animales, OECD N° 407	30
4.3.2 Toxicidad oral aguda: estudio de procedimiento de dosis fija, OECD N° 420	38
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	43
CAPITULO VI: CONCLUSIONES	48
CAPITULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
CAPÍTULO VIII: ANEXOS	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las especies cultivadas de “papa”.	13
Tabla 2. Prueba preliminar cualitativa de los metabolitos de la solución de harina de <i>tocosh</i> de “papa” (<i>Solanum tuberosum</i> L).	26
Tabla 3. Efecto de la solución de harina de <i>tocosh</i> en comparación con el peso relativo de los órganos en las ratas administradas durante 28 días.	30
Tabla 4. Parámetros bioquímicos de las ratas después de la administración con dosis oral repetida de solución de harina de <i>tocosh</i> de 1000 mg/kg durante 28 días.	35
Tabla 5. Evaluación hematológica de las ratas después de la inoculación oral de la harina de <i>tocosh</i> a dosis de 1000 mg/kg por 28 días.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de los alcaloides de la especie vegetal <i>Solanum tuberosum</i> L. “papa”.	2
Figura 2. Procedimiento de extracción “ <i>tocosh</i> de papa” en el Centro Poblado de Chicchuy del distrito de Amarilis, provincia de Huánuco, Perú.	11
Figura 3. Representación del tiempo de retención del estándar de solanina, y el fraccionamiento de su peso molecular, comparado con su abundancia relativa.	27
Figura 4. Representación del alcaloide de solanina, extraída en medio básico, con tiempo de retención 15.17 y representación de la fracción del peso molecular para la identificación del compuesto.	28
Figura 5. Representación del alcaloide de solanina, extraída en medio ácido, con tiempo de retención 15.17 y representación de la fracción del peso molecular para la identificación del compuesto.	29
Figura 6. Microfotografías de las secciones de órganos como: cerebro (A), corazón (B), pulmón (C), hígado (D), bazo (E), estómago (F), riñón (G), testículo (H) de ratas macho que se administró solución de harina de <i>tocosh</i> durante 28 días.	32
Figura 7. Microfotografías de las secciones de órganos como: cerebro (A), corazón (B), pulmón (C), hígado (D), bazo (E), estómago (F), riñón (G), útero (H) de ratas hembra	34
Figura 8. Peso corporal de ratas que se administró la dosis oral repetida de harina de <i>tocosh</i> (1000 mg/kg) durante 28 días. (a) ratas machos y (b) ratas hembras.	37
Figura 9. Microfotografías del tejido hepático de ratones que recibieron una dosis fija de 2000 mg/kg y 5000 mg/kg de harina de <i>tocosh</i> . (Tinción con Hematoxilina - Eosina, 200X).	38

Figura 10. Microfotografías del tejido renal de ratones macho y hembra que 39
recibieron dosis fija de 2000 mg/kg y 5000 mg/kg de harina de *tocosh*.
(Tinción con Hematoxilina - Eosina, 200X).

Figura 11. Microfotografías de tejidos de ratones macho y hembra sin 40
alteraciones significativas que recibieron dosis fija de 2000 mg/kg y 5000
mg/kg de solución de Harina de *tocosh*. Tinción Hematoxilina - Eosina (H&
E) y 40X.

RESUMEN

El *tocosh* de “papa” (*Solanum tuberosum* L.) es utilizado con fines alimentarios y curativos en la medicina tradicional peruana. En la presente investigación se realizó la identificación de los constituyentes fitoquímicos (*screening* fitoquímico preliminar) y luego se determinaron los alcaloides contenidos en la fracción alcaloidal de la harina de *tocosh* de “papa” utilizando la Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (GC-MS). La evaluación de la toxicidad se determinó mediante dos metodologías: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) N° 407 y Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) N° 420; en el primero se administró la solución de *tocosh* de “papa” por vía oral en ratas de ambos sexos por 28 días a la dosis de 1000 mg/kg y en el segundo en ratones de ambos sexos a la dosis fija de 2000 mg/kg y 5000 mg/kg. En el análisis fitoquímico preliminar se determinó la presencia de grupos aminos libres, taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides, triterpeno, esteroides y saponinas, por GC-MS el alcaloide esteroide α -solanina, en la OECD N° 420 se observó durante los 14 días que duró el ensayo, que la dosis letal 50 (DL50) del *tocosh* de “papa” es superior a 2000 mg/kg, pero inferior a 5000 mg/kg en ratones. Y en la OECD N° 407 no se observaron niveles de efectos adversos observables (NOAEL) en la dosis de 1000 mg/kg en las ratas. Se concluye que el *tocosh* de “papa” a la dosis de 1000 mg/kg es seguro a nivel preclínico.

Palabras clave: *Solanum tuberosum* L.; alcaloides; *tocosh* de “papa”; toxicidad; dosis letal 50.

ABSTRACT

Potato tocosh (*Solanum tuberosum* L) is used for food and healing purposes in traditional Peruvian medicine. In the present investigation, the identification of the phytochemical constituents was carried out (preliminary phytochemical screening) and then the alkaloids contained in the alkaloidal fraction of potato tocosh flour were determined by the Gas Chromatography / Mass Spectrophotometry method. (GC-MS). The evaluation of toxicity was determined using two methodologies: Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) N° 407 and Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) N° 420; In the first, the potato tocosh flour solution was administered orally in rats of both sexes for 28 days at the dose of 1000 mg/kg and the second in mice of both sexes at the fixed dose of 2000 mg/kg and 5000 mg/kg. In the preliminary phytochemical analysis, the presence of amines, tannis, phenolic compounds, alkaloids, flavonoids, triterpenes, steroids and saponins Through the use of GC / MS the alkaloid α -solanine was determined. Furthermore, lethal dose 50 (LD50) of OECD N° 420 in potato tocosh flour is more than 2000 mg/kg but less than 5000 mg/kg in mice. OECD N° 407 no adverse effect levels (NOAEL) were observed at the 1000 mg/kg dose in rats. It is concluded that potato tocosh at a dose of 1000 mg/kg is safe at the preclinical level.

Keywords: *Solanum tuberosum* L.; phytochemical constituents; tocosh; lethal dose 50.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El *Solanum tuberosum* L. (Familia: Solanaceae) es una de las especies vegetales más importantes de nuestra “Sierra Peruana”, se produce a lo largo de la “Cordillera Andina” de “América del Sur” y se extiende a otras regiones del mundo ¹. Con el pasar del tiempo, los agricultores andinos desarrollaron cultivos muy resistentes a intensas heladas y sequías, que pueden cultivarse a alturas superiores sobre los 3800 m altitud ¹. En el Perú, existen 3800 tipos de “papa” y son importantes exportadores a nivel mundial ². La “papa” fue domesticada hace poco menos de 10.000 años; Las especies vegetales alimenticias de los cultivos básicos en antiguos peruanos no solo utilizaban la “papa” como alimento, además lo degustaban fermentado y en su estado natural, llamándolo *tocosh* ².

La “papa” fermentada en su estado natural se utilizaba con propósitos medicinales y nutritivos para la población, reside en acomodar el tubérculo en pozos realizados en tierra, que están protegidas con paja o malla y presionados juntamente con piedras, estas deben estar cerca de un arroyo durante un promedio mínimo de seis meses, luego se extrae para su consumo ³. Al finalizar todo el procesamiento, el tubérculo disminuye su forma, a excepción de su envoltura natural, de igual forma se obtiene un olor desagradable muy peculiar. Desde la época de los incas y preincas, los habitantes de las regiones de Ancash, Huánuco y Junín han usado el *tocosh* como medicina, en forma de harina o en su estado natural para preparar mazamorra (*Api* en idioma quechua), que son las mejores formas conocidas de consumo ³. A la harina de *tocosh* se le atribuye algunas propiedades beneficiosas para combatir enfermedades como la gastritis, úlceras, reflujo gastroesofágico y cáncer gástrico ⁴. Las personas la consumen disolviendo una cucharadita por cada 100 mL en agua antes de la comida como un tratamiento alternativo. Aunque el consumo de harina de *tocosh* es invariable, la dosis normal conocida en la medicina tradicional es entre 500 y 1000 mg/kg diarios (esta información se tomó de acuerdo con una entrevista en el lugar donde se recolectó el *tocosh* de “papa”) ⁴. La harina de *tocosh* de “papa” se caracteriza por su olor desagradable, que es lo primero que se percibe, una peculiaridad que no limita su consumo o comercialización, afirmando por el conocimiento empírico de los habitantes de la zona, presenta la característica de ser un antibiótico natural ⁵ y que entre sus innumerables beneficios es capaz de proteger la mucosa gástrica del daño o inflamación, según las

costumbres populares, este producto se utiliza en el posparto, resfriados, neumonía, en la cicatrización de heridas, como antibacteriano, curación de hemorroides y úlceras gástricas, para evitar infecciones gastrointestinales y enfermedades de altura ^{6,7}.

La “papa” (*Solanum tuberosum* L.) es un producto vegetal de utilidad común en la población, que se consume masivamente, y presenta alcaloides esteroidales, cuando no se almacenan de forma adecuada, pueden causar síntomas de intoxicación, como dificultad respiratoria, náuseas, vómitos y diarrea relacionados con la inhibición de la acetilcolinesterasa ^{8,9}. Los glucoalcaloides esteroideos primarios en los tubérculos de “papa” son la α -solanina y α -chaconina, siendo formas glicosiladas del alcaloide esteroidal de la solanidina, estas a menudo mejoran el sabor de la “papa” ¹⁰. La concentración de glucoalcaloides esteroideos aumenta en respuesta a varios factores, como lesiones, ataque de hongos, malas condiciones de crecimiento, clima y condiciones inadecuadas en el almacenamiento ¹¹. Hoy en día, la harina de *tocosh* y sus derivados se venden como productos naturales en los mercados peruanos, pero los estudios de toxicidad y los tipos de alcaloides que producen daño no se ha informado sobre una evaluación de su consumo durante un largo período de tiempo, lo que podría inducir cualquier daño orgánico o muerte cuando no hay datos disponibles sobre las dosis correctas de administración.

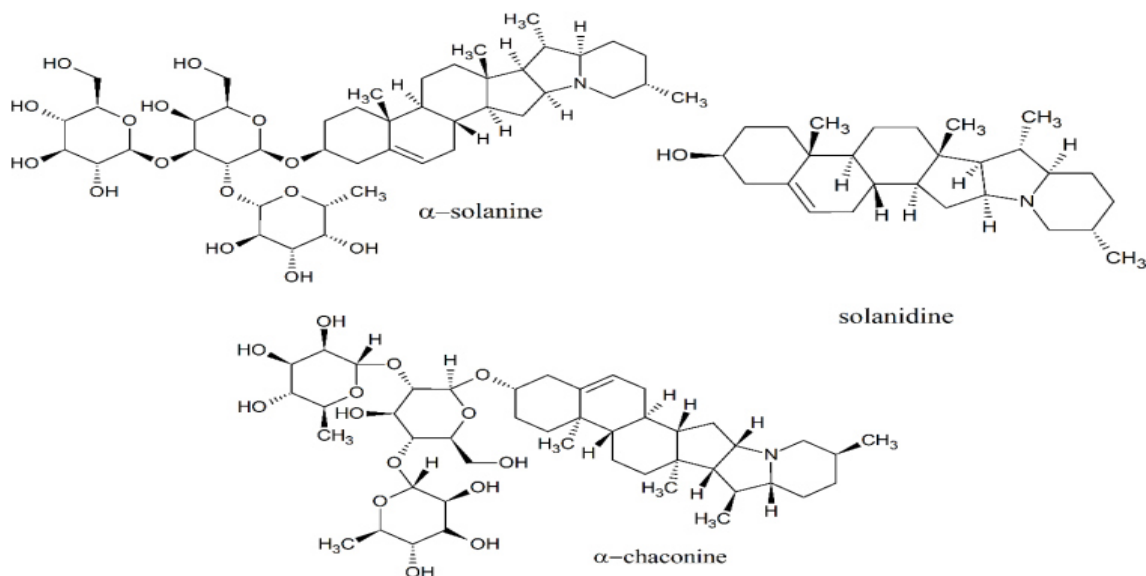


Figura 1. Estructuras químicas de los principales alcaloides de la especie vegetal *Solanum tuberosum* L. “papa” ¹¹.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Determinar los alcaloides de naturaleza tóxica obtenidos del *tocosh* de “papa” (*Solanum tuberosum* L), al analizar el fraccionamiento alcaloidal y realizar la evaluación toxicológica a nivel preclínico.

1.1.2 Objetivos específicos

- Identificar los constituyentes químicos mediante el análisis cualitativo (*screening* fitoquímico preliminar) del *tocosh* de “papa” (*Solanum tuberosum* L).
- Determinar los alcaloides del *tocosh* de “papa” (*Solanum tuberosum* L), por el método de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas GC/MS.
- Evaluar las toxicidades orales según los parámetros de la OECD N° 407-2008 (toxicidad oral a dosis repetida por 28 días) y OECD N° 420-2001 (toxicidad aguda oral a dosis fija) a nivel preclínico.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

2.1.1 Antecedentes a nivel internacional

Ochola J. et al. 2020. Determinaron una función específica de los alcaloides de la “papa” (*Solanum tuberosum*), y de otros miembros de la familia Solanaceae, como control de plagas en los quistes de nemátodos. En lo que respecta en el ensayo de dosis-respuesta, los compuestos que intervinieron en la eclosión de los quistes de nemátodos fueron la α -chaconina y α -solanina que propiciaron una mayor estimulación en la eclosión de los huevos de nematodos de 47 y 42 % respectivamente, y los alcaloides esteroidales (agliconas) como la solanidina, solasodina y el exudado de la raíz de “papa” (PRE) obtuvieron un resultado promedio del 28 % al 21 %, respectivamente, y la tomatidina indujo un respuesta de eclosión baja del 13 %. Sin embargo, los otros compuestos de la familia solanaceae como aminoácidos, fitohormonas y el control negativo (1 % de Dimetilsulfóxido: DMSO en agua) no fueron estimulantes en general. Por lo tanto, concluyeron que el uso de glicoalcaloides esteroidales y sus agliconas presentan una eclosión nematocida en quistes de nematodos, que afianza un resultado prometedor para un enfoque ambientalmente sostenible en el control de plagas ¹².

Romanucci V. et al. 2018. Determinaron que el contenido de “papas” blancas de la variedad marabel, presentan cierto contenido de glucoalcaloides potencialmente tóxicos para la salud, estos metabolitos secundarios son la α -solanina y la α -chaconina. De igual forma informaron que el método para la reducción de glucoalcaloides tóxicos en los cultivos de “papa” blanca de la variedad marabel, consistió en una previa incubación a la oscuridad y una temperatura ambiente durante 24 h. La condición experimental óptima se logró con una solución de NaOH a pH 12. Finalmente se obtuvo una reducción de glucoalcaloides como la α -solanina y la α -chaconina en un 43 % y 27 % respectivamente, lo que permitió garantizar el proceso en referencia a la recolección, almacenamiento y limpieza de las especies de “papa” blanca de la variedad marabel ¹³.

Küster N. et al. 2016. Determinaron que las calisteginas, alcaloides hidroxilados formados por la vía del alcaloide tropano se acumulan en las raíces de la “papa” (*Solanum tuberosum* L., Solanaceae) y en los tubérculos que brotan, estos se establecieron en las plantas de “papa” alteradas genéticamente encontrándose acumuladas calisteginas e intermediarios de su biosíntesis. La supresión de la tropinona

reductasa II reduce drásticamente las calisteginas en los brotes. De igual forma identificaron que la sobreexpresión de putrescina N-metiltransferasa no alteró la acumulación de calistegina ¹⁴.

Hossain MB. et al. 2016. Demostraron que en muestras de “papa” seca se produjo niveles altos de alcaloides esteroidales como α -solanina y α -chaconina, comparando con muestras frescas de “papa”, determinándose por el método de cromatografía líquida de alto-rendimiento acoplado a espectrometría de masas (UHPLC-MS / MS). Sin embargo, los brotes de papa liofilizados y las bayas tenían contenidos de α -solanina significativamente altos de 825 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (PS) en los brotes y 2453 $\mu\text{g/g}$ de PS en las bayas y las muestras secas en horno de vacío fue de 325 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (PS) en brotes y 2080 $\mu\text{g/g}$ PS de bayas. Sin embargo, se observaron una disminución significativa en el contenido de alcaloides esteroidales en la pulpa de “papas” secadas al aire libre, posiblemente debido a la degradación durante el corte de las bayas enteras antes del secado al aire. Finalmente observaron una variación notable en el contenido de alcaloides esteroidales entre diferentes tipos de tejidos de plantas de “papa”, teniendo las flores de “papa” el contenido más alto ¹⁵.

Cárdenas PD. et al. 2015. Realizaron una revisión teórica y científica relacionada a los alcaloides esteroidales en sus formas glicosiladas, miembros de la familia *Solanaceae* y *Liliaceae*. En lo que respecta producto de las revisiones informaron el análisis de coexpresión combinado con el perfil genético de agrupaciones metabólicas de la “papa” y tomate que contienen genes centrales necesarios para la producción de los alcaloides esteroidales en sus formas glicosiladas prominentes de estas dos especies. También proporcionaron los medios necesarios para desarrollar, mediante el mejoramiento clásico o la ingeniería genética, cultivos con niveles modificados de alcaloides esteroidales antinutricionales. Concluyendo producto de las revisiones que el consumo tanto en humanos como en animales, de los alcaloides esteroidales en sus formas glicosiladas se consideran como factores antinutricionales porque afectan la digestión y absorción de los nutrientes en los alimentos e incluso pueden causar intoxicaciones ¹⁶.

Hossain, M B. et al. 2015. Elaboraron un método para afianzar la recuperación de un mayor rendimiento de glicoalcaloides que se encuentran en la cáscara de *patata* usando la extracción líquida presurizada (1,92 mg/g de cáscaras de *patata* secas), en comparación con la extracción convencional sólido-líquido (0,981 mg/g de cáscaras de

patata secas). La metodología de superficie de respuesta corrobora que la temperatura óptima y el solvente de extracción (metanol) para la extracción líquida presurizada (PLE) de glicoalcaloides fue de 80 °C en 89 % de metanol. Usando estas dos condiciones óptimas en la extracción líquida presurizada (PLE), los niveles de alcaloides esteroidales individuales obtenidos fueron de 597, 873, 374 y 75 µg/g de cáscara de *patata* seca para α-solanina, α-chaconina, solanidina y demisidina, respectivamente. Los valores correspondientes para la extracción de líquido sólido fueron 59 %, 46 %, 40 % y 52 % más bajos para α-solanina, α-chaconina, solanidina y demisidina, respectivamente ¹⁷.

Hossain MB. et al. 2015. Trabajaron en el procedimiento de cromatografía líquida por rendimiento ultra-elevado adjunto al espectro de masas (UHPLC-MS / MS) para la cuantificación en alcaloides esteroidales de la “papa”, como son α-solanina, α-chaconina, solanidina y demisidina. De igual forma evaluaron tres columnas químicas diferentes como son el híbrido con puente de etileno (BEH) C18, interacción lipófila / hidrófila y columnas de amida. La columna de híbrido con puente de etileno (BEH) C18 mostró la mejor separación y sensibilidad para los alcaloides. Los datos de precisión estuvieron dentro del rango aceptable del 15 % como se describe en las pautas de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (USFDA). Por lo tanto, concluyeron que la precisión del método cumplió con los criterios y pautas de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (USFDA) con valores de coeficiente de variación (CV) inferiores al 15 % incluso en el límite inferior de cuantificación (LLOQ), mientras que la variación permisible se considera aceptable por debajo del 20 %. La línea de identificación y la línea inferior de valoración (LLOQ) en los cuatro alcaloides estuvieron en el rango de 0.001-0.004 µg/mL mientras que las linealidades de las curvas estándar estuvieron entre 0.980 y 0.995 ¹⁸.

2.1.2 Antecedentes a nivel nacional

Vilca L. 2014. Determinaron la cantidad de antibiótico natural en la especie vegetal de la “papa” (*Solanum tuberosum* L.), de modo fermentado, siendo de la clase Yungay más común, y la fermentación fueron realizados en los días 30, 60 y 90 respectivamente, a una temperatura óptima en la base del ensayo. El ensayo del procedimiento para el antibiótico natural al día 38 para el proceso de fermentación fueron escasas, por lo que, no tuvieron ningún patógeno microscópico en general, el estudio del antibiótico natural

al periodo de dos meses tuvo 21,67 UFC/g de forma media, y el estudio del antibiótico natural a los tres meses estuvo en 340 UFC/g, también se encontraron microorganismos como la especie *Streptomycetaceae* ($5,7 \times 10^5$ UFC/g), mohos ($4,45 \times 10^4$ UFC/g) y hongos ascomicetos unicelulares ($1,8 \times 10^5$ UFC/g) ¹⁹.

2.1.3 Antecedentes a nivel local

Enciso S. et al. 2020. Determinaron el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *tocosh* de “papa” *Solanum tuberosum* (HET) en cuatro concentraciones, contra la bacteria *Streptococcus mutans* ATCC 25175TM. Por lo que al finalizar el ensayo obtuvieron el efecto promedio inhibidor más alto, que se logró con el extracto hidroalcohólico del *tocosh* (HET) al 100 % ($33,1 \pm 2,2$ mm, mostrando una reducción gradual), en comparación con los otros grupos del extracto hidroalcohólico del *tocosh* (HET) al 75 %, 50 % y 25 % ($29,7 \pm 1,3$ mm, $26,6 \pm 2,0$ y $20,1 \pm 1,8$ mm, respectivamente). El análisis inferencial identificó variación matemática de significancia experimental ($p = 0,001$). Donde concluyeron que en el avance de efectividad antibacteriana más elevada se obtuvo con el extracto hidroalcohólico del *tocosh* al 100 %, siendo incluso mayor que el control positivo de clorhexidina al 0.12 %, y fue estadísticamente significativo ²⁰.

Mayta-Tovalino F. et al. 2019. Desarrollaron y evaluaron la actividad antibacteriana y citotóxica de la especie vegetal *tocosh* de “papa” *Solanum tuberosum*, bajo la forma de dentífrico natural, donde el efecto citotóxico no se evidenció porque solo tenía una Concentración Citotóxica 50 (CC50) de 0.26927 mg/mL y 0.26845 mg/mL para las líneas celulares 3T3 y DU145, respectivamente. De igual modo bajo la forma de dentífrico natural (pasta dental) el *tocosh* de “papa” tuvo un efecto antibacteriano positivo contra *S. aureus* y *S. mutans*, generando una actividad óptima frente a estas cepas orales ²¹.

Enciso S. 2019. Determinó la acción antimicrobiana del macerado acuoso con etanol de la “papa” fermentado *tocosh* sobre microorganismos gram positiva a nivel bucal. El promedio del anillo de supresión tuvo un incremento en consecuencia con su elevada purificación en el macerado de la “papa” fermentada *tocosh*, comparándose con el antiséptico y antibacteriano (grupo de control positivo), que configuraba un anillo supresor con una media $26 \text{ mm} \pm 2,57 \text{ mm}$. Finalmente concluyó que el extracto

hidroalcohólico de *tocosh* de “papa” *Solanum tuberosum* a las concentraciones elevadas, medias y bajas de su estado puro tienen labor bactericida frente a *Streptococcus mutans*²².

Carranza R y Huamanchaqui A. 2018. Determinaron el efecto cicatrizante y los metabolitos secundarios del *tocosh* de “papa” (*Solanum tuberosum*) en forma general, resultando moléculas con actividad química tanto en alta como en moderada concentración. Por lo tanto, como resultado se determinó la acción cauterizadora (curativa) de la piel en referencia a la “papa” en su estado fermentado *Solanum tuberosum* bajo la forma de pomada; De igual forma, se identificó que el efecto es mayor en una cantidad del 7 % de “papa” en su estado fermentado, que en comparación al 3 % de membrana testácea de la célula embrionaria de ave de corral, logrando la acción en una semana con frotación en la piel diariamente mañana y tarde²³.

Arratea B y Mamani Y. 2017. Determinaron la actividad antibacteriana de las especies de *tocosh* de “papa” y aceite esencial de tomillo. Donde concluyeron en su estudio que frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* el macerado acuoso de la “papa” fermentada presenta efecto bactericida identificada como aprobatoria en el marco del Instituto de Estándares para el Laboratorio y la Clínica (CLSI) y excelente según escala de Duraffourd. Sin embargo, el tomillo, presenta efecto antibacteriano promedio en base a las normas estandarizadas actuales, y escala muy sensible según el método utilizado en el mismo ensayo²⁴.

Jiménez E. et al. 2017. Evaluaron los rasgos de seguridad de las principales especies de bacterias lácticas (LAB) producidas en el *tocosh*, producto de fermentación de la “papa”, donde mostraron actividades antibacterianas y capacidad de producción de aminos biogénicos. El inventario molecular logrado por el método de secuenciación de alto rendimiento (HTS) proporcionó información sobre la composición de la población de LAB durante la fermentación de este producto ancestral fermentado de “papa”, mientras que el cultivo permitió la selección de cepas adecuadas para el diseño de nuevos cultivos funcionales para la producción de productos con almidón fermentado²⁵.

Loli, R. et al. 2016. Determinaron la acción regenerativa del *tocosh* de “papa” sobre las úlceras gástricas, dando un resultado superior en comparación a los efectos de los fármacos como el omeprazol y la ranitidina que se utilizaron como control. Así dieron a

conocer que la porción de “papa” fermentada consumida en cantidad elevada presenta actividad beneficiosa frente a la pared del estómago con presencia de heridas lacerantes en tiempo de 2 a 3 días por consumo ingestivo, comparándose con el medicamento antiulceroso (inhibidor de la bomba de protones) a la dosis respectiva farmacológica según guía de tratamiento. Concluyendo que la administración oral de la sopa de *tocosh* de “papa” presenta efecto regenerativo a nivel de la mucosa del sistema digestivo en tratamiento de heridas o úlceras lacerantes, ocasionadas por alcohol, en ratas de laboratorio ²⁶.

Sandoval, M. et al. 2015. Demostraron que el *tocosh* de “papa”, ofrece efecto citoprotector a nivel del estómago y elevada capacidad antioxidante. En el revelado fitoquímico se encontró sustancias químicas de composición exclusiva en esta especie vegetal. En lo que respecta a cantidades muy elevadas protege casi un 100 % los sitios de las paredes del estómago, y en cantidades elevadas más del 90 % y las cantidades bajas entre un 80 % y 90 %. Además, la administración de cantidades elevadas comprobó ser más citoprotectora y las dosis de las cantidades muy elevadas mejor acción protectora de la célula contra los radicales libres, como grupo control de comparación se utilizó un antiulceroso de vía oral a una dosis de 30 mg/kg ²⁷.

2.2 Aspectos teóricos

2.2.1 El *tocosh* de “papa”

La descripción *tocosh* se enmarca en la representación escrita *togosh*, que significa ajado y en mal estado en el idioma andino. Es una especie vegetal alimentaria con beneficios nutritivos y terapéuticos, en el propósito del procedimiento, es un método antiguo de trabajo en la “Sierra Peruana”, a través de un proceso de cambio de este tubérculo andino (“papa”), se realiza la identificación de compuestos contra un número determinado de microorganismos ^{27, 28}.

2.2.2 Principios activos

La “papa” en su estado de fermentación *tocosh* es identificado como un símbolo en la biofarmacia natural, corroborando su molécula activa en un antibiótico base ²⁸, es decir es un antibiótico natural, por lo que la linealidad esta afianzada en el tratamiento de patologías indicadas para el sistema digestivo ²⁹.

2.2.3 Estudio fitoquímico

El conocimiento propio de las posibles actividades de la especie vegetal, es en base a los estudios del *screening* fitoquímico, donde se identificaron sustancias polifenólicas, compuestos alcaloidales triterpénicos y esteroidales, carbohidratos con mínimo número de carbonos y péptidos de proteínas libres como principales moléculas del tubérculo *Solanum tuberosum* L ^{27, 28}. Es por ello que a partir de los mencionados estudios se puede establecer las posibles actividades propias de esta especie, que hoy en día contribuye a un consumo arduo por parte de la población en general para aliviar diferentes molestias que contribuyen a la mejora y recuperación de su propia salud ²⁷.

2.2.4 Características del *tocosh* de “papa”

Resultado de la consistencia interna que pasa por un proceso natural de fermentación, el procedimiento establece la estimulación de un compuesto que es perjudicial para las bacterias (sustancia bactericida y bacteriostática). De la base del mismo, es secado al sol (naturalmente) y por molienda se elabora el polvo del *tocosh*, y de este por cocimiento se obtiene la sopa o mazamorra, etc; presenta un fuerte olor característico no satisfactorio para la población, por el proceso de putrefacción que tuvo en el periodo de tiempo transcurrido, pero la consideración más importante son las principales propiedades nutritivas y medicinales que presentan ²⁹.

- Componentes: harinas y azúcares, polipéptidos macromoleculares, elevado contenido de calorías y mínima cantidad de colesterol *LDL* (Lipoproteína de baja densidad) y triglicéridos; - Aspecto visible: claro - Consistencia: polvo ²⁹.

2.2.5 Usos medicinales del *tocosh* de “papa”

Esta especie vegetal, debido a los metabolitos propios que presenta según estudios se le atribuye ciertas propiedades medicinales, que hoy en día son fuente de curación de ciertas enfermedades. Por la técnica del procedimiento de putrefacción del tubérculo se produce este antibiótico natural, direccionando una acción antibacteriana. También es excesivamente aplicado en patologías de amplio régimen hospitalario y de consultoría externa frecuentes como en casos por infecciones bacterianas, a nivel pulmonar, estomacal, riñones y dificultad en las articulaciones. De forma tradicional este tubérculo presenta su frecuencia en las mujeres después de la expulsión del feto en las últimas semanas, en situaciones de resfriado, hemorroides, problemas a nivel del hígado y en las

causas de neumonía, demostró de igual forma ser efectiva en infecciones oportunistas y de fortalecer y elevar el sistema inmunológico ¹⁹.

2.2.6 Preparación del *tocosh* de “papa” (*Solanum tuberosum* L)

La forma de preparación del *tocosh* en lo que respecta de la “Sierra del Perú” es distinta de las demás regiones y de ella depende para que se establezca y concentre su elevado valor nutricional. Este tubérculo alimenticio es depositado en un agujero de entre 50 a 70 cm de fondo, en el que anteriormente se introdujo un costal, cubriendo al máxima a esta especie vegetal (“papa”), protegiendo el trabajo de cosecha de los aguaceros, poniendo encima para cubrirlo rocas medianas o fragmento de arena endurecido, y terminando la puesta con la misma tierra del suelo, para establecer su estancia por el tiempo de aproximadamente de seis meses a más, dependiendo del volumen y masa del tubérculo utilizada y temporada estacional, estos deben estar cerca de una corriente de agua o arroyo para el proceso de hidratación y putrefacción. Pasado ese periodo, la “papa” que está adherida al costal es colocada fuera de la dirección solar hasta la filtración total del agua y sequedad. Finalmente se escoge el *tocosh* que se obtuvo para ser consumido previo lavado o llevarse a la venta del mercado para su comercialización, depositando al mismo sitio aquellos que no cumplen con la inspección visual por el proceso de putrefacción para su acondicionamiento por más tiempo ³⁰.



Figura 2. Procedimiento de extracción del *tocosh* de “papa” en el Centro Poblado de Chicchuy - Amarilis – Huánuco - Perú.

2.2.7 Cultivo de la “papa” (*Solanum tuberosum* L)

El tubérculo de la “papa” es oriunda de los lugares altiplánicos de nuestro país, de los países con relieves andinos. Cosechada y recolectada por poblaciones de naturaleza altiplánicas por más de miles de años ³¹. Este vegetal de la familia solanácea cuenta con especies de grupos vegetales que involucra el resultado de un gran diseño y variabilidad genética agrupando un número mayor de 2000 grupos vegetales de su variedad familiar y menos de una decena de tubérculos domesticados en huertos. Estos grupos de vegetales crecen en todo el territorio americano. Los indicios de esta diversificación se deben a los cambios de la flora. El origen de esta gran diversidad se debe entre otros a la evolución botánica y genética, la colonización, transformación en el material hereditario vegetal, polinización vegetal y fecundidad con acoplamiento de material genético cruzado ³². Este tubérculo es identificado como un material comestible altamente nutritivo, que proporciona energía, vitaminas hidrosolubles y minerales de forma general que son de amplio beneficio ³³.

2.2.8 Descripción botánica (*Solanum tuberosum* L)

Este tubérculo es integrante del grupo de las solanáceas, aconteciendo sus principales aportes nutricionales y su variabilidad genética siendo tetraploides ($2n=48$) ³⁴.

Es una especie vegetal de la familia de las angiospermas, presenta dos cotiledones, su vástago es vertical rígido que crece en función aproximada de 0.59 centímetros (cm) a 1.49 o 1.51 metros (m) de altura ³⁵. Sus hojuelas se articulan por separado, con 8 foliolos aproximadamente. Los aspectos florales presentan 5 pétalos y 5 estambres, siendo estas trímeras. Existe cambio en la visibilidad colorimétrica de rosado pálido, violeta claro o violeta oscuro, o combinación aparejada de los mismos, que está ligada a la siembra y cosecha. Las partes florales mayormente son fecundadas solas, conciben una pulpa carnosa pequeña de menos de 3 cm de diámetro, de color natural verdusco y forma redonda con contenido de granos sexuales de propagación ³⁶.

La “papa” presenta vástagos modificados de aspecto rígido que abarcan sistemas importantes de almacenamiento vegetal. Se originan a partir de las ramas rastreras que producen el tallo y como consecuencia dan lugar al proceso de floramiento, que dura menos de 50 días posterior a la cosecha. La vitalidad fisiológica de esta especie vegetal se

obtiene a los 4 meses en diversidades después de la madurez, 3 meses en diversidades medias y 2 meses con 15 días en diversidades tempranas ³⁴.

2.2.9 Clasificación taxonómica de la “papa” (*Solanum tuberosum* L)

Según (Huamán, Z., & Spooner, D. M. 2002, citado por Taylor, M. A. et. al 2007) ^{37, 38}, fundamentándose en los aspectos morfológicos, este tubérculo es descrito en base al criterio botánico sistemático:

Reino: *Plantae*

Núcleo: *Solanaceae*

Grupo: *Solanum*

Clase: *Petota*

Las clases de estas especies de tubérculos tienen una división y clasificación más profunda debido a las variedades de “papas” que existen según su estado natural y artesanal para consumo en toda la población ³⁸.

En el presente periodo se encuentra un registro detallado del escalafón de la biología vegetal del presente tubérculo (“papa”), con el pasar del tiempo se describieron diferentes aspectos botánicos de esta especie vegetal, que direccionaron a la creación de centros taxonómicos que aportaron registros detallados a lo largo de la historia. En la tabla 1, se describe los registros del número de cromosomas vegetales en base a la clasificación del género de cultivadas y estudiadas por diferentes investigadores a lo largo del tiempo ³⁹.

Tabla 1. Descripción según variación cromosómica de los cultivos del género *solanum* e investigaciones por diferentes autores.

Ploidia	Hawkes (1990)	Ochoa (1990, 1999)	Spooner et al., (2007)
2x	Describió los detalles según registro de las especies en cultivos	<i>S. ajanhuiri</i> <i>S. stenotomum</i> <i>S. goniocalyx</i> <i>S. phureja</i>	Realizaron el registro de las especies de “papas”, basándose en el agrupamiento según sus
3x	naturales, acoplando 21 variedades que	<i>S. x chaucha</i> <i>S. x juzepzukii</i>	aspectos morfológicos, cromosómicos, y

4x	contendrían grupos de vegetales tuberosos y no tuberosos	<i>S. tuberosum</i> <i>ssp. andigena</i> <i>ssp. Tuberosum</i> <i>S. hygrothermicum</i>	condiciones de cultivos de dos formas: especies altoandinas naturales y silvestres.
5x		<i>S. curtilobum</i>	<i>S. ajanhuiri</i> (2x) <i>S. x juzepzukii</i> (3x) <i>S. tuberosum</i> (4x) <i>S. curtilobum</i> (5x)

Fuente: Rodríguez, L. 2009 (Aportado último, Spooner et al. 2007) ⁴⁰.

2.2.10 Condiciones climáticas (*Solanum tuberosum* L)

Este tubérculo para su mejoramiento físico de sus diferentes partes necesita estar cultivada a temperatura ambiente, por lo que, algunos autores lo refieren que también puede ser una especie de necesidad periódica en función a las temperaturas que ocurren durante las 24 horas, para propiciar el aspecto de mejora de la planta ³⁶.

La dimensión del hábitat de la presente especie oscila en el rango de los 1500 - 2500 msnm. La base máxima del crecimiento de la especie vegetal está influenciada por el rango de las temperaturas promedios durante la noche y la intensidad de ocurrencias del descenso de estas ^{34, 36}.

2.2.11 Importancia de la “papa” (*Solanum tuberosum* L)

Esta especie vegetal contribuye a la nutrición total del ser humano, proporciona biomoléculas sustancialmente beneficiosas para la salud tras su ingesta y combaten la eliminación de radicales libres. Las sustancias beneficiosas presentes en la “papa” con actividad neutralizante contra los radicales libres son: vitamina c, vitamina e, vitamina a (ácido retinoico), y compuestos alcaloidales, considerado el más representativo. En lo que respecta tanto la pulpa como la cáscara de la “papa” albergan compuestos que neutralizan los radicales libres, identificándose que la mayor parte de compuestos polifenólicos se encuentran en la parte externa de la “papa”, derivados de otras moléculas iniciales con actividad antioxidante, induciendo el consumo de este producto por su calidad alimentaria a nivel comercial ^{41, 42}. Las sustancias neutralizantes de radicales libres presentan acciones funcionales a nivel celular dentro de nuestro cuerpo, por lo que los compuestos neutralizantes no permiten el envejecimiento y la destrucción

de la célula por estas especies oxidantes, Por lo que los componentes que tiene este tubérculo alimenticio ayudan activando el proceso normal de la célula para complementar la funcionalidad en cada órgano, evitando el deterioro de los mismos por la alteración oxidativa de estos radicales a nivel celular ^{42,43}.

2.2.12 Evaluaciones toxicológicas

2.2.12.1 OECD N° 407: Toxicidad oral a dosis repetida por 28 días ⁴⁴

Los lineamientos de la OECD en las pruebas de sustancias químicas se verifican cada cierto tiempo a la luz del progreso científico. La guía de prueba (TG) 407 original se adoptó a inicios de los años 80. Y a mitad de los años 90 se generó para su uso una literatura mucho más sofisticada, para conseguir información adicional del animal utilizado en el estudio, en particular sobre neurotoxicidad e inmunotoxicidad.

En 1998, la OECD inició una actividad de alta prioridad, para revisar las pautas de prueba existentes y para desarrollar nuevas Pautas de prueba para la detección y prueba de posibles disruptores endocrinos. Un elemento de la actividad fue actualizar la guía existente de la OECD para el "estudio de toxicidad oral de 28 días con dosis repetidas en roedores", con numeración de ensayo 407, mediante estándares complementarios para identificar los valores de los procedimientos hormonales y la variación de las sustancias endocrinas de prueba. Este sistema se afianzó un riguroso y elevado análisis mundial en relevancia al conocimiento de las diferentes variables e indicadores adicionales, el rendimiento de estas variables para productos químicos con funcionalidad inhibitoria a nivel de las hormonas sexuales y reguladores del metabolismo en la lectura extensiva a nivel laboratorio con mínimo número de obstáculos descritos por los indicadores de estudio del numeral 407 del ensayo, lo que garantiza un buen ensayo. Esta guía es el resultado del resumen de un número determinado de ensayos a nivel mundial que garantiza su rigurosa y excelente aplicación. En la TG 407 permite que ciertos efectos mediados de naturaleza endocrina se pongan en contexto con otros efectos toxicológicos.

El producto a realizar el ensayo se administra por 28 días, para establecer criterios en su actividad toxicológica, se utilizan animales de experimentación donde la sustancia se dosifica por vía oral, de forma diaria hasta el término de la prueba, en esta se observan diferentes características y comportamientos en el animal de prueba, con la posibilidad

de determinar la toxicidad de la misma, para los exámenes macroscópicos y microscópicos los animales mueren durante el ensayo por la sustancia inoculada siendo esta tóxica o se espera hasta el final para que sean sacrificados sometiéndolos a eutanasia para su posterior autopsia. El presente ensayo de toxicidad subaguda OECD N° 407, incorpora datos de los análisis toxicológicos, dependiendo de la toxicidad de la sustancia de prueba administrada de forma diaria, en lo que respecta apertura la investigación de llegar a unas dosis orales más extensas por más tiempo, afianzando un aspecto crónico si es que se establece alguna patología producto de la administración continuada de la sustancia. Los datos derivados del uso del TG deben permitir la identificación absoluta de la toxicología del producto mediante las pruebas macroscópicas y microscópicas, una indicación de la linealidad de la cantidad administrada con el efecto obtenido es la determinación del nivel de efecto adverso no observado (NOAEL).

Se deben usar por lo generalmente recomendable ratas de laboratorio, en la misma proporción de machos que hembras, por el nivel de dosis establecido. La planificación de la muerte del animal por razones de estudio debe aumentarse según la cantidad de los mismos programados para ser sacrificados antes de la finalización del estudio. Se debe considerar la posibilidad de un grupo satélite adicional de diez animales (cinco por sexo) en el control y en el grupo de dosis superior para la observación de reversibilidad, permanencia o manifestación tardía de los síntomas toxicológicos, al menos hasta la mitad de los días del tiempo total del ensayo después de la administración de la sustancia de prueba.

Generalmente, deben utilizarse a los menos tres conjuntos de animales para el ensayo más un grupo de blanco, en lo que respecta si no se obtiene resultados tóxicos en las dosis más bajas e incluyendo la dosis de 1000 mg/kg/día, se puede realizar una prueba límite. Si no hay datos adecuados disponibles, se puede realizar un estudio de determinación de rango (ratas de igual raza y sexo) en contribución a las dosis que se utilizará. A excepción del tratamiento con el producto de prueba, las ratas del grupo de blanco y de dosis tienen la misma forma de manipulación hasta la culminación del ensayo. En el contexto de la utilización del vehículo para inocular el producto de prueba, los blancos del ensayo deben recepcionar el vehículo en la cantidad más alta utilizado.

2.2.12.2 OECD N° 420: Toxicidad aguda oral - procedimiento de dosis fija ⁴⁵

Los lineamientos de la OECD en las pruebas de sustancias químicas se verifican cada cierto tiempo a la luz del progreso científico o las prácticas de evaluación cambiantes. La Directriz 420 original se adoptó en julio de 1992 como la primera alternativa a la prueba de toxicidad aguda convencional, descrita en la Guía de Prueba 401.

Como punto importante del ensayo se debe utilizar empezar con dosis menores, hasta obtener los datos de toxicidad, sin necesidad de utilizar la dosis más alta, salvo por criterios de seguridad animal. Además, las dosis que se sabe que causan dolor y angustia marcados, debido a acciones corrosivas o muy irritantes, no necesitan ser administradas. Los animales que producto de la administración de la sustancia que quedaron casi al borde de la muerte serán sacrificados humanamente, al igual que aquellos que llegaron hasta el final de la prueba. Las actitudes personales afianzados en dar por finalizado la vida de seres vivos que son utilizados en las pruebas de experimentación, que sufrieron causas extremas y que sufren severamente, y la orientación sobre el reconocimiento de una muerte predecible o inminente, son el tema de un documento de orientación separado.

Los ratones o ratas (animales recomendados) según sexo y raza son dosificados en un ensayo por etapas utilizando las dosificaciones bajas hasta la más alta en función a los grupos de trabajo establecido (excepcionalmente, se puede considerar una dosis fija adicional de 5000 mg/kg), después de conocer y estudiar la sustancia de prueba. Los signos clínicos y las condiciones asociadas con el dolor, el sufrimiento y la muerte inminente se describen en detalle en un documento de orientación de la OECD.

Excepcionalmente, solo cuando esté justificado por necesidades reglamentarias específicas, se puede considerar utilizar la dosificación más alta correspondiente a 5000 mg/kg. Por razones a la preocupación de la seguridad del ser vivo de prueba, no se recomienda los análisis de animales en los rangos de Categoría 5 del SGA (2000-5000 mg/kg) y solo se debe considerar cuando existe una gran probabilidad de que los resultados de tal prueba tengan una relevancia directa para proteger a los humanos o animales considerando la salud y el medio ambiente.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño de investigación

Cuantitativa: Los datos obtenidos con características específicas se aplicaron para la realización del estudio.

Experimental: Porque se evaluó un fenómeno dado introduciendo elementos que pueden modificar el comportamiento de las variables en estudio, los que fueron medidos en determinados momentos.

Longitudinal y Exploratorio: Porque se realizó un seguimiento de los elementos a trabajar, describiendo datos para el análisis del comportamiento según los resultados.

Prospectivo: La investigación se proyectó a través del tiempo para el desarrollo de los resultados.

3.2 Población de estudio

3.2.1 Recolección de material de trabajo

El *tocosh* de “papa” fue recolectado en el Centro Poblado de Chicchuy, entre los límites de los caseríos de Yaca y Panao Pampa del distrito de Amarilis, provincia de Huánuco (10°00'13" S, 76°12'17" W), Perú ⁴⁶ (Anexo N° 1). La identificación taxonómica de la especie vegetal, según variedad de “papa” que se utilizó para la elaboración de *tocosh* corresponde a la de "*walash*", una muestra fue depositada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), para su clasificación correspondiente y emitido mediante documento de Ref. CONSTANCIA No. 038-USM-2020. (Anexo N° 2).

3.2.2 Obtención de los animales de experimentación

Los animales de experimentación utilizados fueron ratas albinas hembra y macho de la especie *Rattus norvegicus* cepa Holtzman, y ratones albinos hembra y macho especie *Mus musculus* cepa BALB/c/CNPB, obtenidos en el Centro Nacional de Productos biológicos del Ministerio de Salud, y con las condiciones sanitarias para el desarrollo de las evaluaciones según el CERTIFICADO SANITARIO N° 230-2019. (Anexo N° 3).

3.3 Tamaño de muestra

3.3.1 Preparación y tratamiento del *tocosh* para su conversión en harina

El *tocosh* de “papa” recolectado de los pozos de cosecha, fue lavado para eliminar materias extrañas, polvo, tierra e impurezas, luego se dejó secar durante tres semanas a la sombra en el lugar donde fue obtenido, con temperaturas entre 15°C – 25 °C. El *tocosh* seco se pulverizó, usando un molino de cuchillas. El producto obtenido se denominó harina de *tocosh* y se almacenó hasta su uso posterior.

Se obtuvo 400 gramos de harina de *tocosh* de “papa” a partir de 1 kilogramo de *tocosh* de “papa” fresca, que se realizó mediante muestreo por conveniencia, seleccionando las “papas” medianas en el proceso de obtención para el *tocosh*.

3.3.2 Especie animal

En el ensayo de la OECD N° 407-2008, se utilizó un total de 20 ratas albinas de ambos sexos, siendo 10 ratas hembra y 10 ratas macho de la especie *Rattus norvegicus* cepa Holtzman, obtenidos del Instituto Nacional de Salud, sanas y con la aclimatación apropiada, edad apropiada (12 semanas), peso ideal ratas macho: 160 – 180 g, ratas hembras: 150 – 170 g, correspondiente a la evaluación de la toxicidad y estipulada en el presente protocolo ^{4, 44}.

Para el ensayo de la OECD N° 420-2001, se utilizó un total de 20 ratones albinos de ambos sexos, 10 ratones macho y 10 ratones hembra de la especie *Mus musculus* cepa BALB/c/CNPB, obtenidos del Instituto Nacional de Salud, con la aclimatación apropiada, sanos y edad (ratones: 8 semanas), peso ideal ratones macho de 30 – 32 g y ratones hembra 25 – 30 g, estipulada en el presente protocolo ^{4, 45}.

Para el trabajo con los animales de experimentación el protocolo fue presentado y aprobado por el Comité de Ética de la Unidad de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM, (Documento No 0198 / FFB-UDI-2019.11OCT2019. REGISTRO No 010-CE-UDI-FFB -2). (Anexo N° 4).

3.4 Técnicas de recolección de datos

3.4.1 Análisis cualitativo (*screening* fitoquímico preliminar) ⁴⁷

El análisis fitoquímico cualitativo se realizó mediante pruebas fisicoquímicas de caracterización según la metodología de Lock de Ugaz, Olga (2016), mediante cambios de coloración o formación de precipitados. Este ensayo fue trabajado en el laboratorio de farmacognosia de la facultad de farmacia y bioquímica - UNMSM.

De igual forma se procedió a realizar las reacciones de identificación o coloración para cada tipo de metabolito secundario presente, con los reactivos específicos; los cuales se expresaron como presencia o ausencia del metabolito.

- **Determinación de saponinas**

Prueba de la espuma

A una solución de la muestra de harina de *tocosh*, se le sometió a agitación vigorosa durante 30 segundos. La formación de espuma confirma la presencia de saponinas.

- **Determinación de flavonoides**

Reacción de shinoda

En un tubo de ensayo se adicionó 1 mL de solución de harina de *tocosh* previamente filtrada y le añadimos 3 gotas del ácido clorhídrico concentrado + limaduras de magnesio. Interpretación: Si se observa después de 10 minutos un intenso burbujeo y coloración roja, naranja o amarilla, confirma la presencia de flavonoides.

- **Determinación de compuestos fenólicos**

Reacción con cloruro férrico (FeCl₃)

A un 1 mL de solución de harina de *tocosh* se le agregó 5 gotas del reactivo. Interpretación: si aparece un color verde, azul o negro, indica la presencia de compuestos fenólicos.

- **Determinación de taninos**

Reacción de la gelatina

A 1 mL de solución de harina de *tocosh* se le agregó 5 gotas del reactivo de gelatina al 1 %. Interpretación: Es positiva si se observa la formación de una nube en la solución y luego queda en el fondo un precipitado color blanco, confirma la presencia de taninos.

- Determinación de alcaloides

Reacción de dragendorff

A 1 mL de la solución de harina de *tocosh* filtrada se le adicionó 1 gota de ácido clorhídrico concentrado y 1 gota del reactivo. Interpretación: Si se observa la aparición de un precipitado de color naranja al rojo, confirma la presencia de alcaloides.

Reacción de mayer

A 1 mL de solución de harina de *tocosh* filtrada se le adicionó 1 gota de ácido clorhídrico concentrado y 1 gota del reactivo. Interpretación: Si se observa la aparición de un precipitado blanco, confirma la presencia de alcaloides.

- Determinación de quinonas

Reacción de bornträger

A 10 mg de la muestra de harina de *tocosh* se le adicionó 10 gotas de cloroformo, se filtró, y se adicionó 5 gotas de KOH 5%. Interpretación: La formación de una coloración roja confirma la presencia del metabolito.

- Determinación de triterpeno y/o esteroides

Reacción de lieberman-burchard

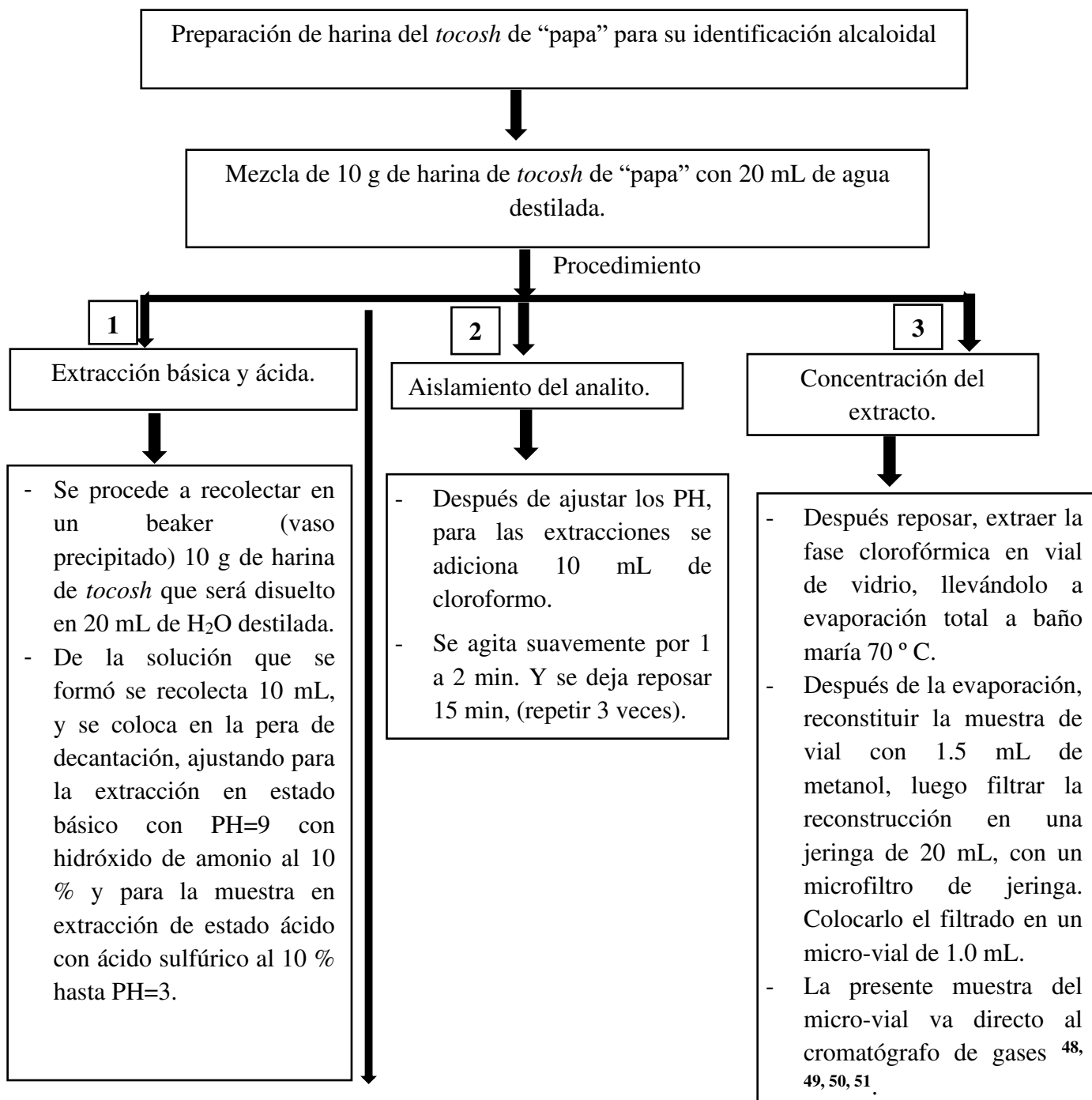
A 1 mg de la muestra de harina de *tocosh* se le adicionó se le adicionó 10 gotas de cloroformo, luego se filtra y se adiciona 5 gotas de anhídrido acético con 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Interpretación: Si la reacción da un color verde o rojo, confirma la presencia del metabolito.

- Determinación de los grupos aminos libres

Reacción de ninhidrina

A 5 mg de la muestra de harina de *tocosh* se le adicionó 5 gotas del reactivo, si se observa que la muestra se torna de un color violeta, lo que confirma la presencia del metabolito.

3.4.2 Determinación de alcaloides por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)



Identificación de compuestos por cromatografía de gases / espectrometría de masas (CG/MS)

El equipo que se utilizó para el análisis de harina de *tocosh* tuvo las siguientes características:

MS: *Thermo Scientific* TSQ 9000

Cromatografía de gases.

Columna. *Thermo*: TG-SMS – 30 m
Scientific x 0.25 mm x 0.25 μ m

Horno. T° inicial: 70 °C x 0.5 min

Rampa: 20 °C/min hasta 320 °C X
6.0 min

Tiempo total: 19 min

Equipo: GC – MS – MS.

GC: *Thermo scientific* trace 1300

Inyector. T°: 280 °C

Modo. *Splitless*: *Splitless time* 1.0 min

Flujo constante: 1.5 mL/min

Flujo de purga: 5.0 mL/min

Espectrometría de masas-masas.

Temperatura de línea de transferencia: 280 °C

Temperatura de fuente de iones: 240 °C

Modo: *full scan* (50-900)

Modo de ionización: E I

Tiempo total: 19 min

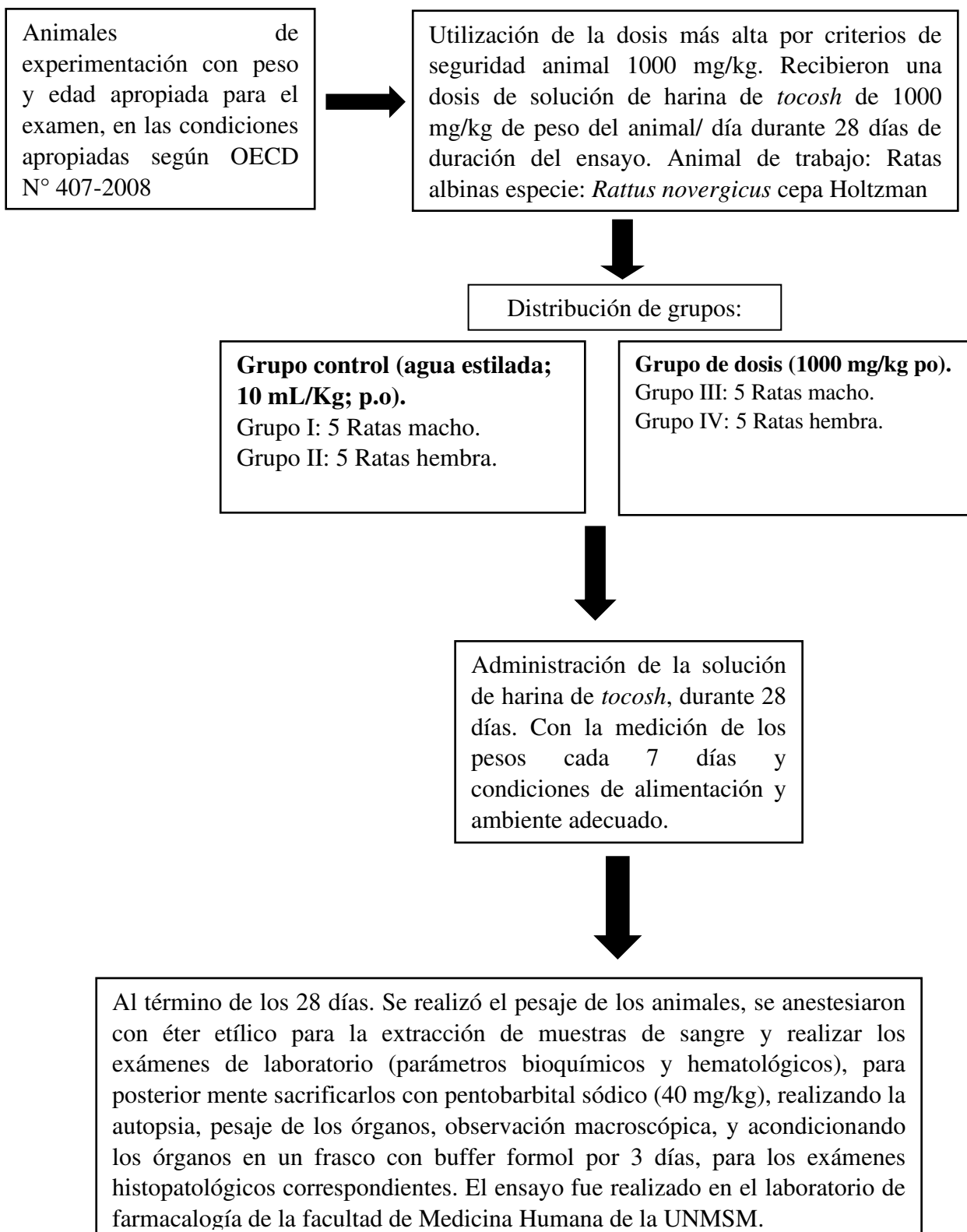
Preparación de lectura del equipo.

- La cantidad líquida para la inoculación de la muestra fue de 1 mL, procedente de la reconstitución. Periodo de transito de 60 min. Lecturas del Masa / Masa: Temperatura de fuente de iones 240 °C, temperatura de línea de transferencia: 280 °C, Las moléculas fueron determinadas en base a la fuente de alimentación bibliográfica del sistema que direcciona la base de datos del equipo (cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas), comparando el tiempo de retención, fracciones del peso molecular e identificación de espectros de la masa general ⁵².
- Se utilizó como estándar el alcaloide de solanina 5 mg, para la validación del equipo en la obtención del resultado. (Anexo N° 5).

3.4.3. Evaluación de estudio de toxicidades orales en animales de experimentación

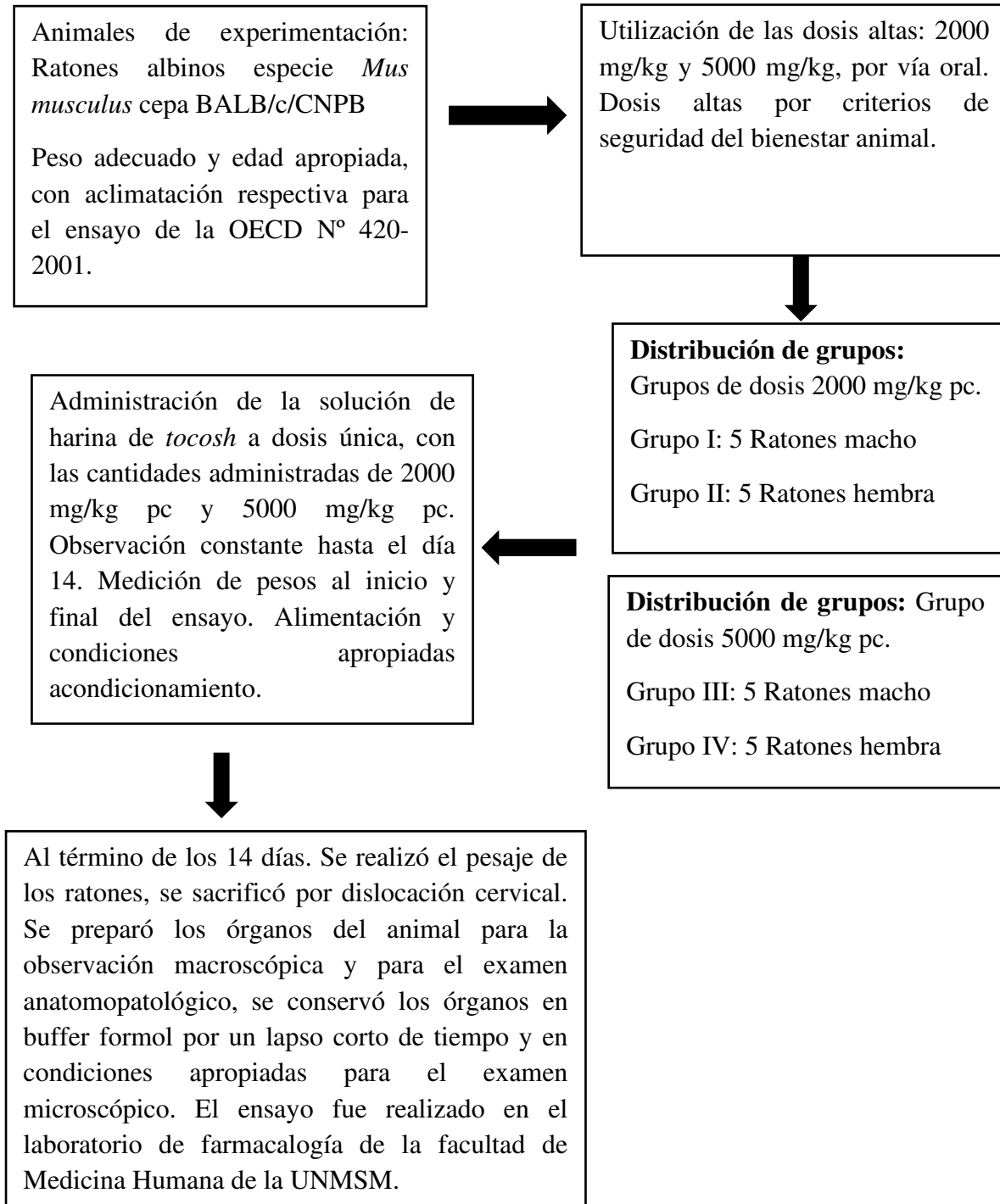
- Toxicidad oral: Estudio de dosis repetida por 28 días en animales. OECD N° 407 4, 44

Protocolo de administración de la OECD N° 407-2008.



- Toxicidad oral aguda: estudio de procedimiento de dosis fija. OECD N° 420 4, 45

Protocolo de administración de la OECD N° 420-2001.



CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1 Análisis fitoquímico

Los metabolitos secundarios identificados mediante el *screening* fitoquímico preliminar, siguiendo la metodología de Lock de Ugaz, O. 2016, fueron:

Tabla 2. Prueba preliminar cualitativa de los metabolitos de la harina de *tocosh* de “papa” (*Solanum tuberosum* L).

Prueba de caracterización	Resultado	Metabolito secundario
Reacción de la NINHIDRINA	(+)	Grupos aminos libres
Reacción de la GELATINA	(+)	Taninos
Reacción con CLORURO FERRICO (FeCl ₃)	(+)	Compuestos Fenólicos
Reacción de DRAGENDÖRFF	(+)	Alcaloides
Reacción de MAYER	(+)	Alcaloides
Reacción de SHINODA	(+)	Flavonoides
Reacción de BORNTRAGER	(-)	Quinonas
Reacción de LIEBERMAN- BURCHARD	(+)	Triterpeno, esteroides
Prueba de la ESPUMA	(+)	Saponinas

(-) = Ausencia; (+) = Presencia

4.2 Determinación de alcaloides por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)

En este ensayo, se logró identificar la solanina presente en la fracción alcaloidal del *tocosh* de *Solanum tuberosum*.

Compuesto	Alcaloide identificados	t_R (min)	m/z ($M + H$) ⁺	Fórmula molecular
1	solanina	Estándar: 15,18 Extracción Básica - Ácida: 15,17	868,1	$C_{45}H_{73}NO_{15}$

Estándar de α -solanina

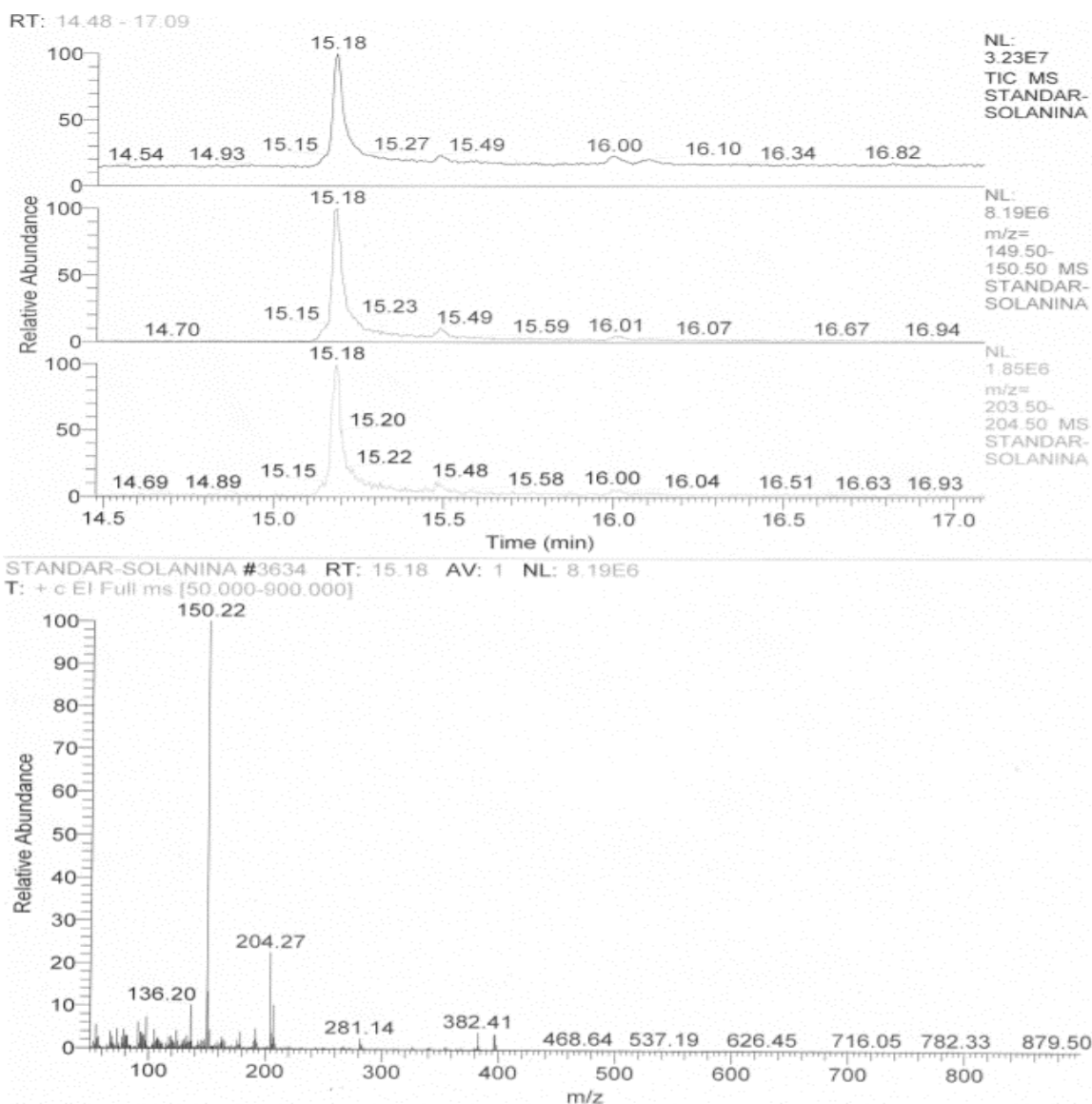


Figura 3. Representación del tiempo de retención del estándar de solanina, y el fraccionamiento de su peso molecular, comparado con su abundancia relativa.

Determinación de α -solanina

Extracción- Medio básico

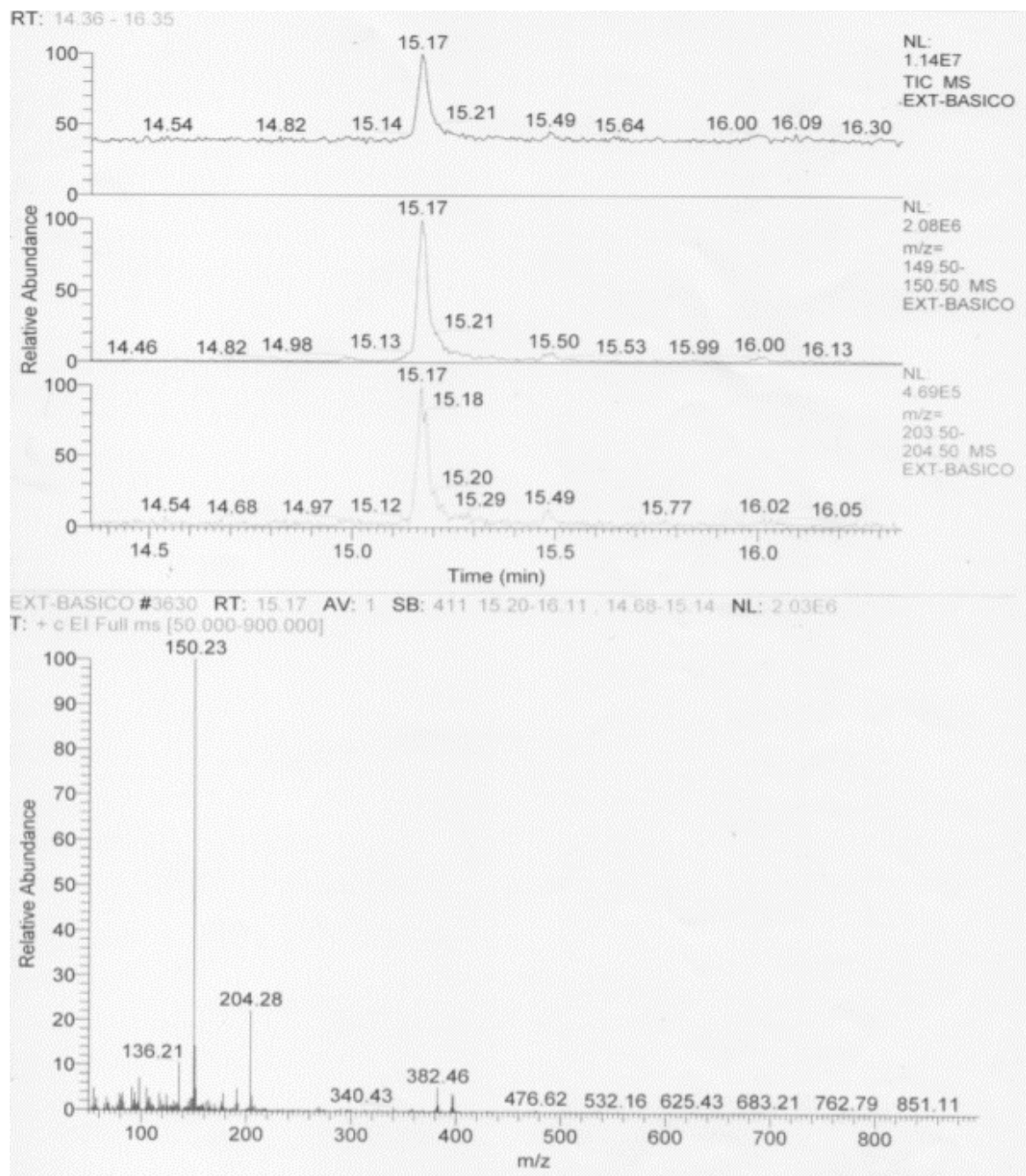


Figura 4. Representación del alcaloide de solanina, extraída en medio básico, con tiempo de retención 15,17 y representación de la fracción del peso molecular para la identificación del compuesto.

Determinación de solanina

Extracción- Medio ácido

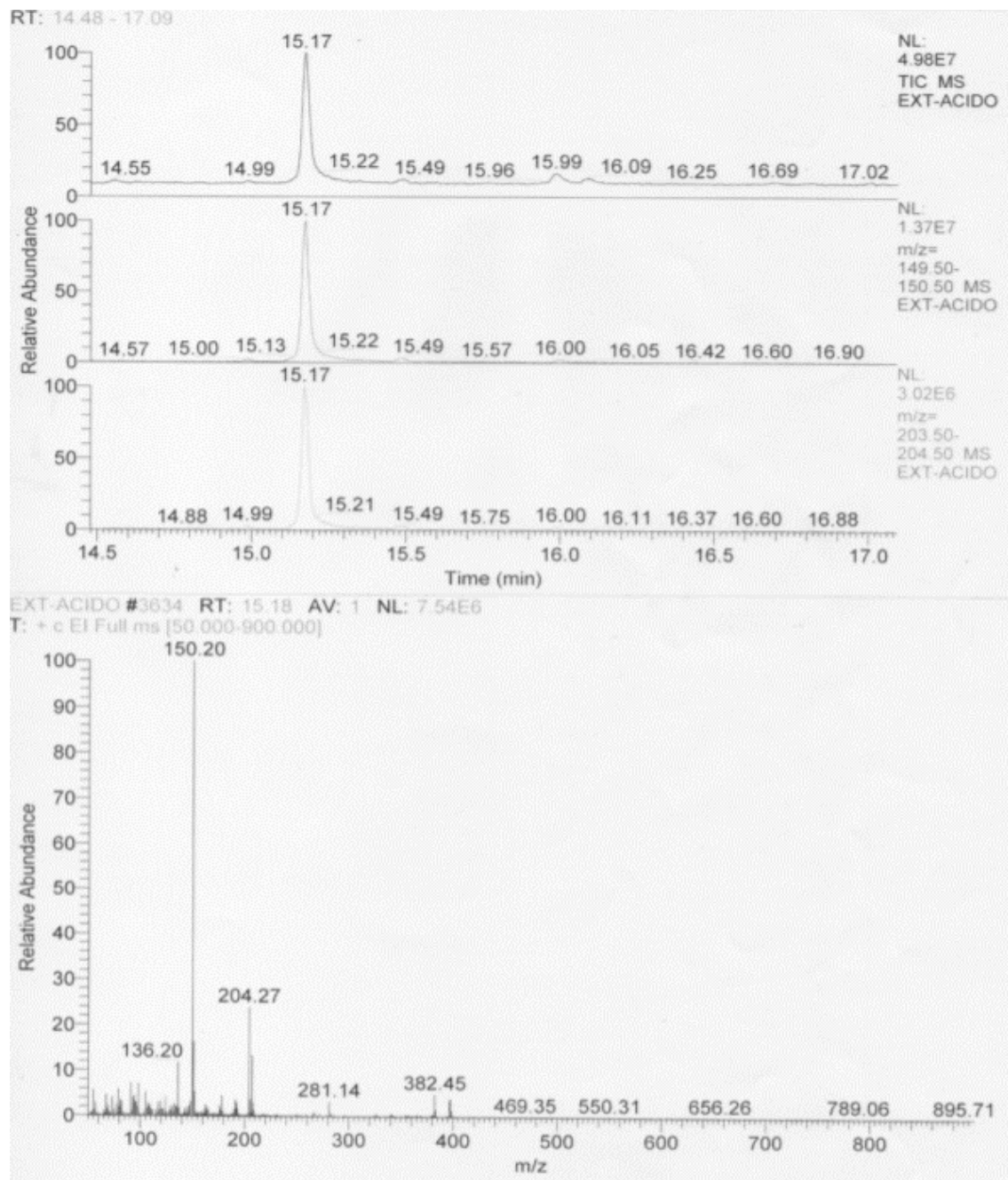


Figura 5. Representación del alcaloide de solanina, extraída en medio ácido, con tiempo de retención 15.17 y representación de la fracción del peso molecular para la identificación del compuesto.

4.3 Evaluación de estudio de toxicidades orales en animales de experimentación.

4.3.1 Toxicidad oral: Estudio de dosis repetida por 28 días en animales. OECD N° 407

Todas las ratas hembra y macho que recibieron la solución de harina de *tocosh* a la cantidad dosificada de 1000 mg/kg/día por 28 días sobrevivieron y no se observaron aspectos tóxicos. En los pesos relativos de los órganos, el hígado de ambos animales tuvo un aumento significativo ($p < 0.05$), que se comparó con el grupo control. Los demás órganos de los animales evaluados no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$) en comparación con el grupo control (Tabla 3).

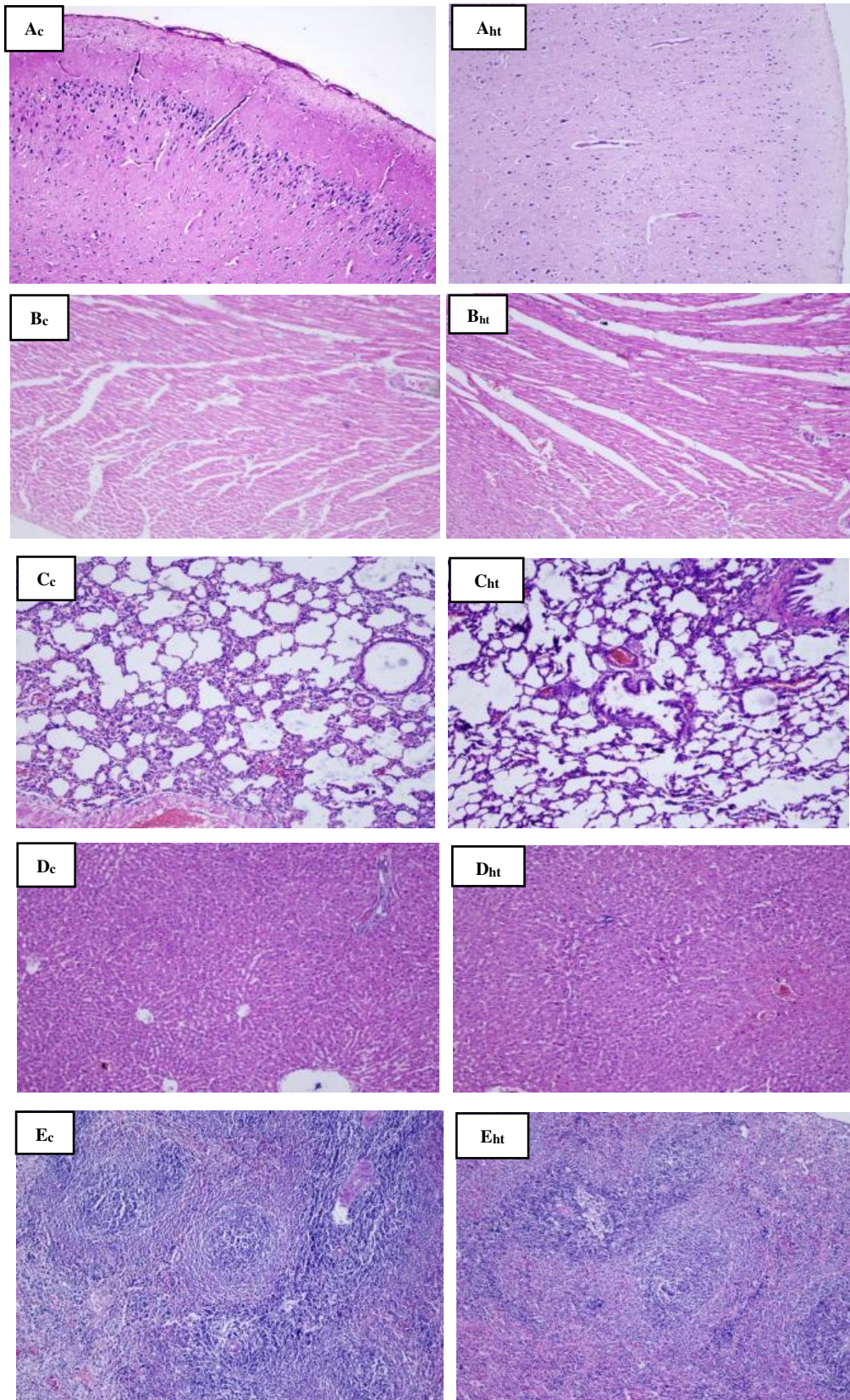
Tabla 3. Efecto de la solución de harina de *tocosh* administradas a las ratas durante 28 días para comparar el peso relativo sus órganos.

Órganos	Grupo control	Harina de <i>tocosh</i> dosis: 1000 mg/kg
Ratas macho	n=5	n=5
Cerebro	0.70 ± 0.03	0.65 ± 0.01
Corazón	0.35 ± 0.00	0.37 ± 0.05
Pulmón	0.48 ± 0.06	0.50 ± 0.15
Hígado	2.96 ± 0.34	$3.48 \pm 0.33^*$
Bazo	0.18 ± 0.04	0.26 ± 0.05
Estómago	0.76 ± 0.03	0.73 ± 0.06
Riñón	0.60 ± 0.07	0.76 ± 0.05
testículo	1.73 ± 0.05	1.77 ± 0.28
Ratas hembra	n=5	n=5
Cerebro	0.78 ± 0.10	0.69 ± 0.05
Corazón	0.40 ± 0.01	0.41 ± 0.03
Pulmón	0.47 ± 0.12	0.62 ± 0.04
Hígado	2.83 ± 0.02	$3.28 \pm 0.25^*$
Bazo	0.24 ± 0.04	0.26 ± 0.04
Estómago	0.62 ± 0.01	0.54 ± 0.04
Riñón	0.66 ± 0.03	0.68 ± 0.01
Útero	0.47 ± 0.00	0.45 ± 0.06

Los valores se expresaron como Media \pm SD, Comparado con el control, es significativo cuando * ($p < 0.05$). Los datos fueron analizados usando la Prueba T de *Student*. No existen valores de control históricos disponibles.

No existieron casos de muerte de los animales de experimentación durante 28 días. El examen microscópico de cada órgano en las ratas hembra y machos no mostró anomalías ocasionado por el producto (*tocosh* de “papa”) debido a que no hubo

toxicidad en órganos, como son el cerebro, corazón, pulmón, hígado, bazo, estómago, riñón, testículos y útero, comparándose con el grupo control (Figura 6) (Figura 7).



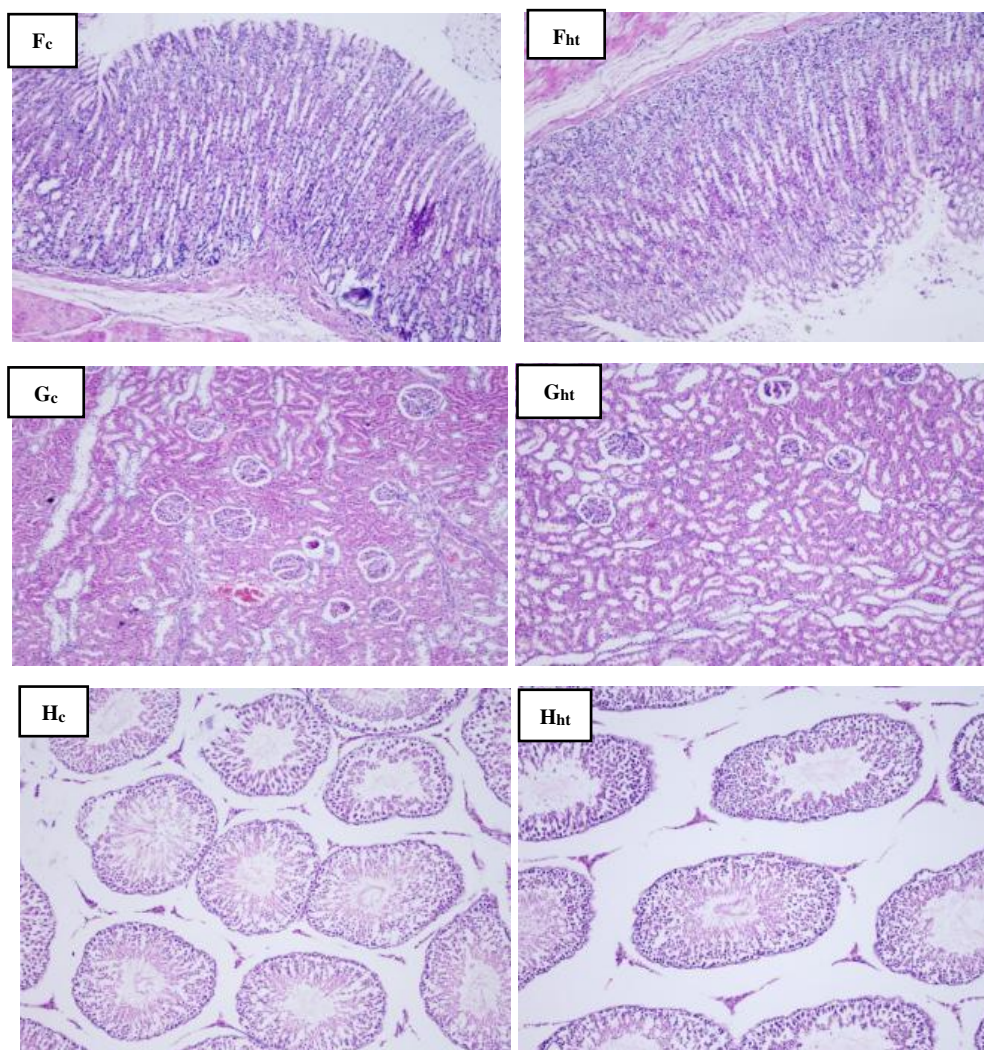
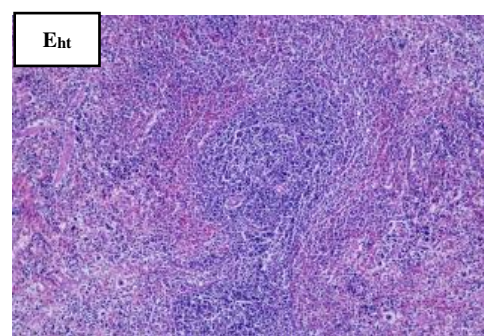
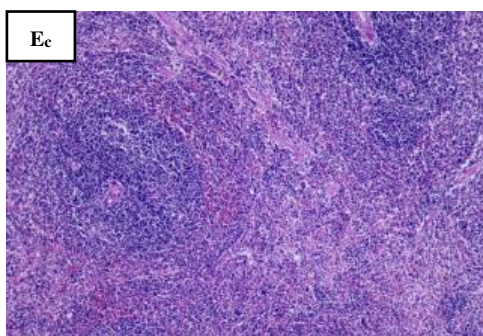
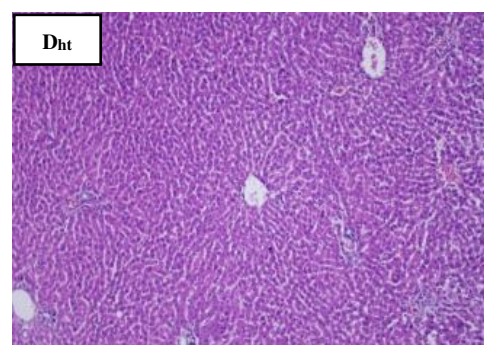
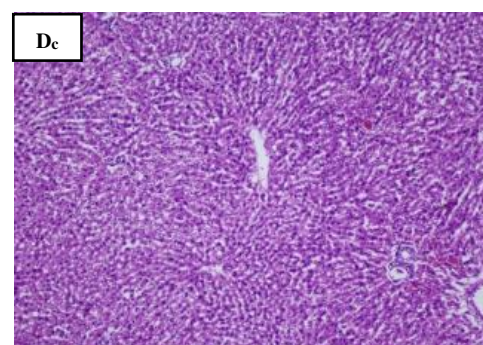
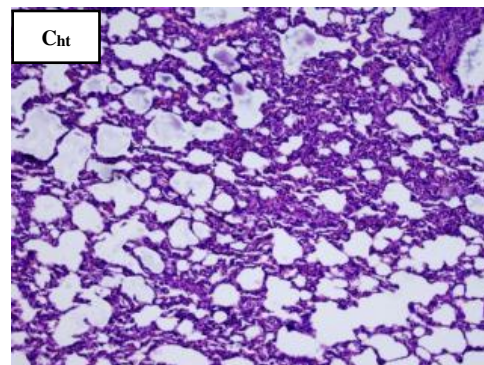
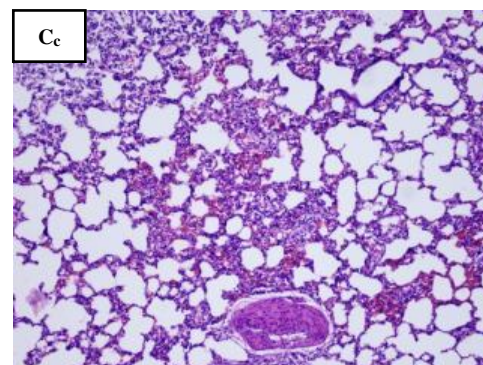
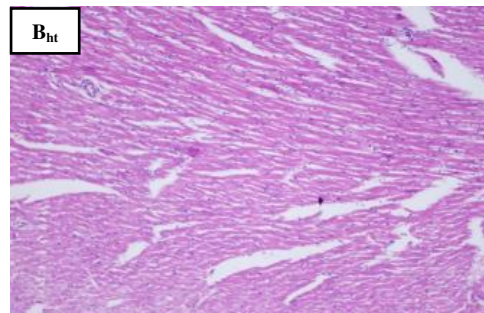
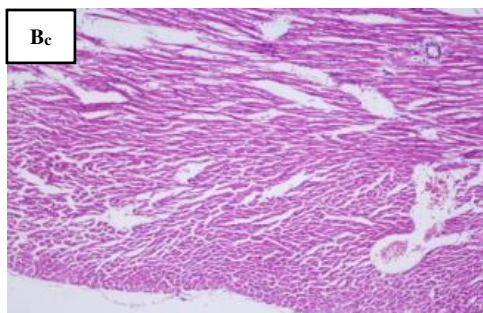
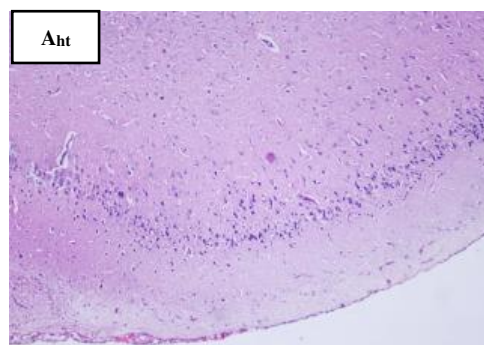
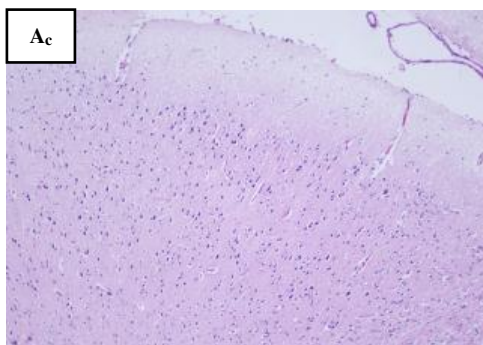


Figura 6. Microfotografías de las secciones de órganos como: cerebro (A), corazón (B), pulmón (C), hígado (D), bazo (E), estómago (F), riñón (G), testículo (H) de ratas macho que se administró solución de harina de *tocosh* durante 28 días. El subíndice (c) y (ht) se refieren a los grupos de control y harina de *tocosh* a dosis 1000 mg/kg/día, respectivamente. Tinción H-E, 40X.



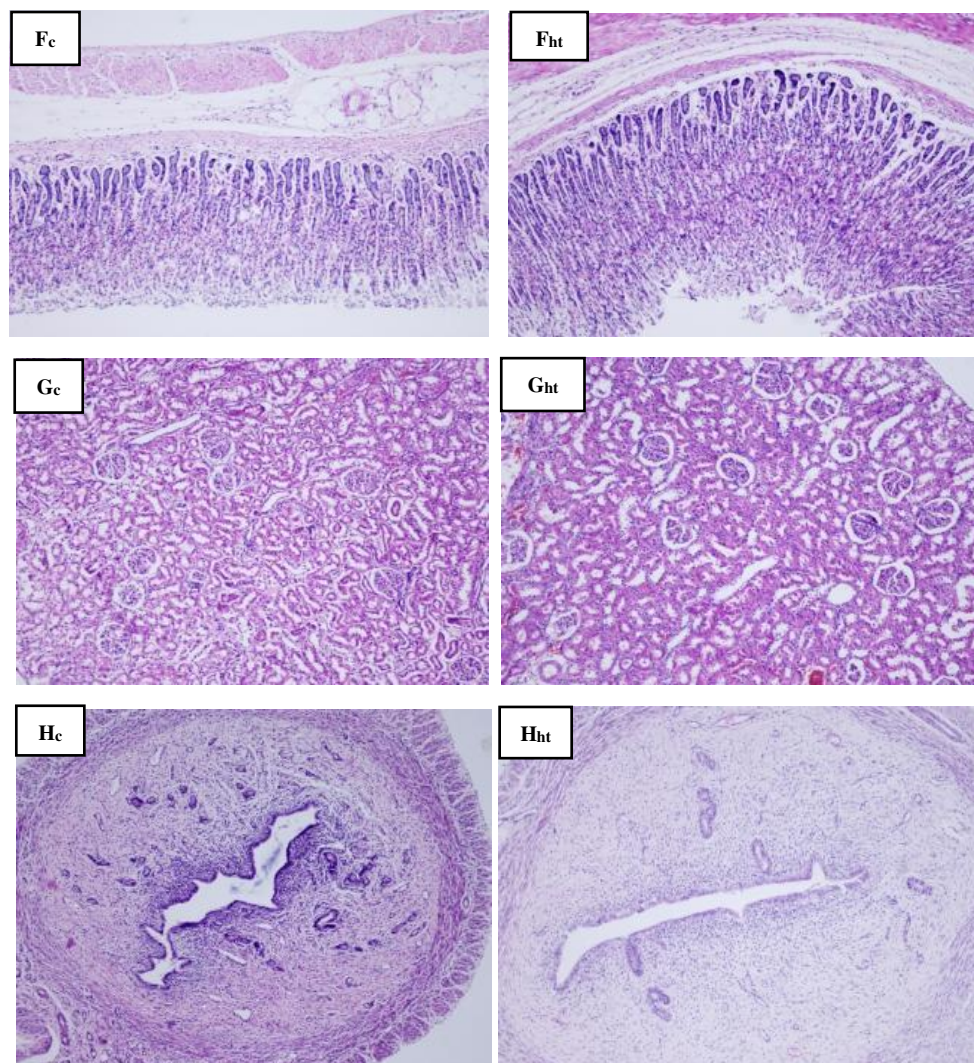


Figura 7. Microfotografías de las secciones de órganos como: cerebro (A), corazón (B), pulmón (C), hígado (D), bazo (E), estómago (F), riñón (G), útero (H) de ratas hembra que se administró solución de harina de *tocosh* durante 28 días. El subíndice (c) y (ht) se refieren a los grupos de control y harina de *tocosh* a dosis 1000 mg/kg/día, respectivamente. Tinción H-E, 40X.

Al final de los 28 días, los niveles de enzimas hepáticas se mantuvieron en relación con el grupo de control tanto en las ratas macho y hembra, no hubo variación en los parámetros bioquímicos respectivos, solo se registró una ligera variación en el aumento significativo del colesterol LDL en ratas hembra y macho, y una disminución en los triglicéridos solo en las ratas machos. (Tabla 4) En los parámetros hematológicos, no hubo diferencia excepto por una leve variación significativa del porcentaje de

monocitos en ratas macho, los demás resultados de los parámetros hematológicos no presentaron diferencias significativas con el grupo control (Tabla 5).

Tabla 4. Parámetros bioquímicos de las ratas después de la administración con dosis oral repetida de solución de harina de *tocosh* de 1000 mg/kg durante 28 días.

Parámetros	Grupo control	Harina de <i>tocosh</i> dosis: 1000 mg/kg
Ratas macho	n=5	n=5
AST (IU/L)	133.00 ± 4.00	108.50 ± 1.50
ALT (IU/L)	69.50 ± 3.50	70.00 ± 1.50
Fosfatasa alcalina (IU/L)	231.00 ± 9.00	238.50 ± 0.50
Bilirrubina Total (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Proteína Total (g/dL)	6.95 ± 0.05	7.01 ± 0.05
Albumina (g/dL)	3.80 ± 0.20	3.95 ± 0.05
Globulina (g/dL)	3.15 ± 0.25	3.00 ± 0.10
Colesterol Total (mg/dL)	59.50 ± 0.50	60.00 ± 0.00
Triglicéridos (mg/dL)	134.50 ± 8.50	107.00 ± 13.00*
HDL (mg/dL)	12.50 ± 0.50	10.60 ± 0.40
LDL (mg/dL)	20.00 ± 3.00	28.00 ± 3.00*
Glucosa (mg/dL)	100.50 ± 0.50	108.50 ± 1.50
Urea en suero (mg/dL)	37.50 ± 1.50	40.50 ± 2.50
Creatinina en suero (mg/dL)	0.44 ± 0.01	0.44 ± 0.03
Ratas hembra	n=5	n=5
AST (IU/L)	116.50 ± 0.50	116.50 ± 0.50
ALT (IU/L)	65.50 ± 0.50	63.00 ± 1.00
Fosfatasa alcalina (IU/L)	235.50 ± 5.50	223.00 ± 17.00
Bilirrubina Total (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Proteína Total (g/dL)	6.90 ± 0.30	6.90 ± 0.20
Albúmina (g/dL)	3.80 ± 0.20	4.10 ± 0.00
Globulina (g/dL)	3.05 ± 0.05	2.80 ± 0.20
Colesterol Total (mg/dL)	57.00 ± 3.00	59.50 ± 0.50
Triglicéridos (mg/dL)	139.00 ± 1.00	130.50 ± 10.50
HDL (mg/dL)	9.55 ± 0.25	8.25 ± 0.25
LDL (mg/dL)	18.00 ± 2.00	25.00 ± 2.00*
Glucosa (mg/dL)	110.50 ± 3.50	113.00 ± 2.00
Urea en suero (mg/dL)	35.50 ± 2.50	34.00 ± 0.00
Creatinina en suero (mg/dL)	0.40 ± 0.02	0.46 ± 0.01

Los valores se expresan como media ± DE, en comparación con el control es significativo cuando * (p <0,05). Los datos se analizaron mediante el examen T de *Student*. Existe variación significativa de aumento en el colesterol *LDL* (lipoproteínas de baja densidad), en ambos animales, sin embargo, en las ratas macho se observa una disminución significativa en sus triglicéridos. No existen valores de control históricos disponibles.

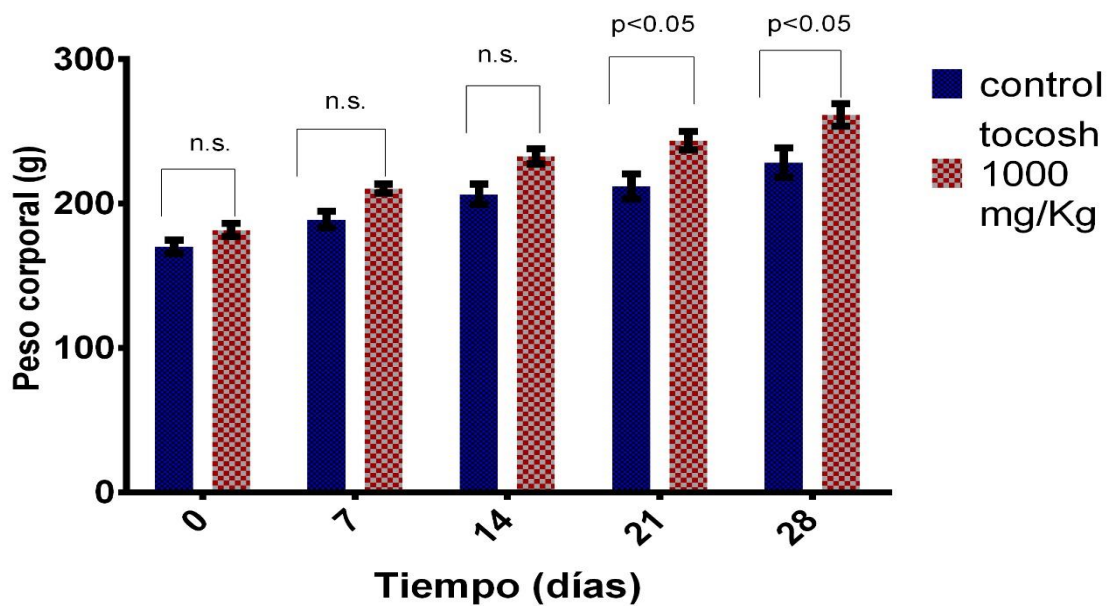
Tabla 5. Evaluación hematológica de las ratas después de la inoculación oral de la harina de *tocosh* a dosis de 1000 mg/kg por 28 días.

Parámetros	Grupo control	Harina de <i>tocosh</i> dosis: 1000 mg/kg
Ratas macho	n=5	n=5
Glóbulos Rojos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	7.09 ± 0.30	7.30 ± 0.08
Glóbulos Blancos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	4.14 ± 0.13	3.91 ± 0.17
Hemoglobina (g/dL)	14.70 ± 0.60	14.65 ± 0.15
Hematocrito (%)	41.80 ± 1.80	43.55 ± 1.45
Eosinófilos (%)	1.50 ± 0.50	1.00 ± 0.00
Basófilo (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Monocitos (%)	1.00 ± 0.00	$2.00 \pm 0.00^*$
Segmentados (%)	20.50 ± 8.50	17.00 ± 4.00
Linfocitos (%)	77.00 ± 9.00	80.50 ± 4.50
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	7.5 ± 0.26	7.22 ± 0.22
Ratas hembra	n=5	n=5
Glóbulos Rojos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	7.00 ± 0.10	6.93 ± 0.22
Glóbulos Blancos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	4.03 ± 0.18	4.20 ± 0.30
Hemoglobina (g/dL)	14.65 ± 0.25	14.60 ± 0.10
Hematocrito (%)	42.00 ± 0.00	41.50 ± 0.50
Eosinófilos (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Basófilo (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Monocitos (%)	2.50 ± 0.50	$1.50 \pm 0.50^*$
Segmentados (%)	24.00 ± 1.00	17.00 ± 1.00
Linfocitos (%)	79.00 ± 1.00	80.50 ± 0.50
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	7.3 ± 0.20	7.6 ± 0.35

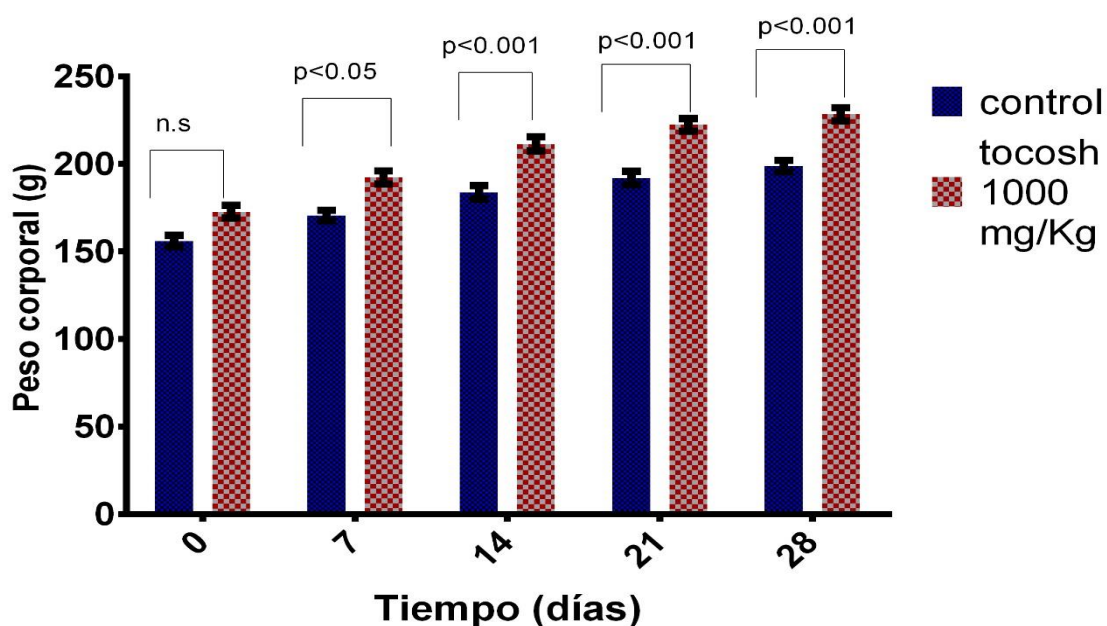
Los valores se expresan como media \pm DE, en comparación con el control es significativo cuando * ($p < 0,05$). El registro se analizó mediante el examen T de *Student*. Solo existió una leve variación significativa del porcentaje de monocitos en ratas macho. No hay valores de control históricos disponibles.

El peso corporal de las ratas macho a las que se les inoculó de forma oral la harina de *tocosh* en solución a una dosificación de 1000 mg/kg/día aumentó desde la primera semana de $181,8 \pm 9,28$ g hasta el final de la cuarta semana, $261,4 \pm 15,67$ g, en relación con el grupo control, que estos tuvieron el total de $170,2 \pm 9,20$ g hasta $228,4 \pm 20,24$ g el día 28, lo que fue significativo ($p < 0,05$). De manera similar el peso de las ratas hembra que se administró una cantidad de 1000 mg/kg del mismo producto tuvo un comienzo en incremento desde la primera semana en $172,8 \pm 7,14$ g hasta $228,4 \pm 7,66$ g correspondiente al final de la última semana, en comparación con la agrupación de

blancos (control) de ratas hembra que fue $156 \pm 6,63$ g hasta $198,8 \pm 6,62$ g siendo significativo ($p < 0.001$) (Figura. 8)



(a)



(b)

Figura 8. Peso corporal de ratas que se administró la dosis oral repetida de harina de *tocosh* (1000 mg/kg) durante 28 días. (a) ratas macho y (b) ratas hembra. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ comparado con el control, usando la prueba t de *Student*.

4.3.2 Toxicidad oral aguda: estudio de procedimiento de dosis fija, OECD N° 420

Los pesos de los ratones a los que se administró la harina de *tocosh* en cantidades con 2000 y 5000 mg/kg se determinaron antes de la administración del producto de prueba, se calcularon y se volvió a registrar al final de los 14 días, con aumento de peso al final del experimento. Por lo que existió variación de incremento de los pesos correspondiente a la dosis. En la dosis de 2000 mg/kg administrado a ratones macho el peso inicial y al termino de los 14 días fue de 32.4 ± 1.96 g hasta 34.4 ± 2.06 g y en ratones hembra 29.4 ± 0.80 g hasta 30.6 ± 0.80 g. Y en la dosis de 5000 mg/kg los pesos individuales de los animales también se incrementaron al termino de los 14 días desde 35.2 ± 1.17 g hasta 39.8 ± 1.60 g en los ratones macho y desde 31.4 ± 1.02 g hasta 33.2 ± 1.17 g en los ratones hembra. Al final de la presente prueba, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical con el propósito de realizar el estudio macroscópico y microscópico de los órganos.

Los ratones administrados a dosis de 2000 mg/kg y 5000 mg/kg de peso corporal presentaron daño orgánico menor en el hígado (linfocito parenquimatoso) y riñón (acumulación de linfocito) de acuerdo con las Figuras 9 y 10. Sin embargo, no se observaron signos de toxicidad durante el estudio, solo se evidencio daño hepático y renal en el estudio, tras la realización del examen anatomopatológico.

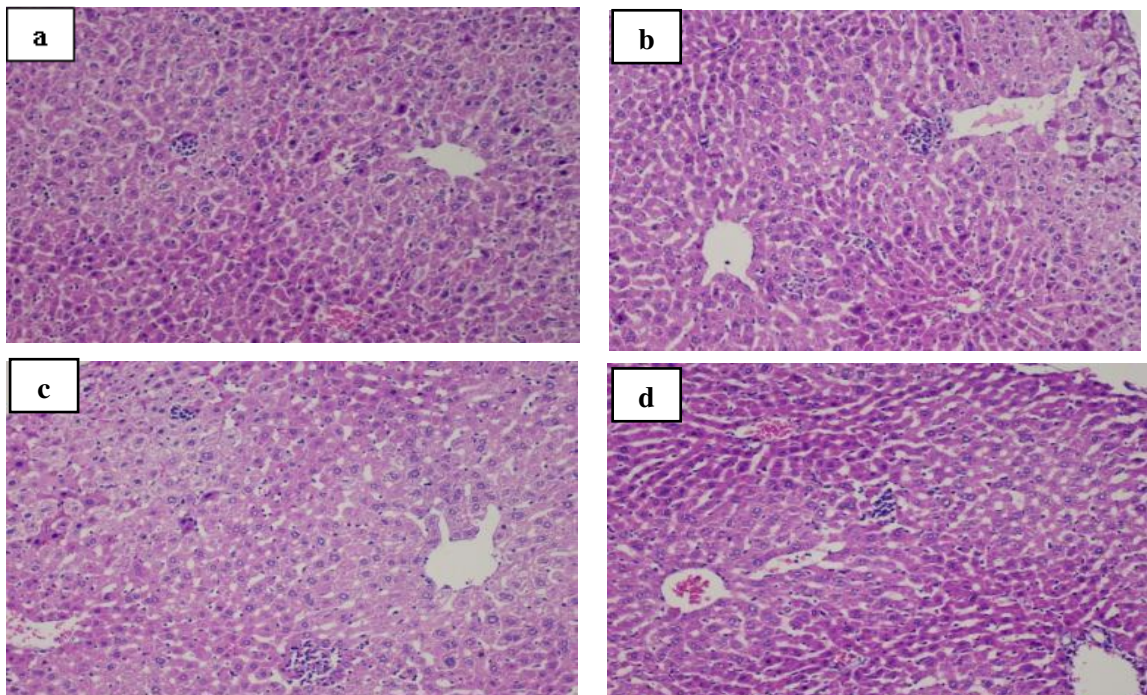


Figura 9. Microfotografías del tejido hepático de ratones que recibieron una dosis fija de 2000 mg/kg y 5000 mg/kg de harina de *tocosh*. (Tinción con H&E, 200X).

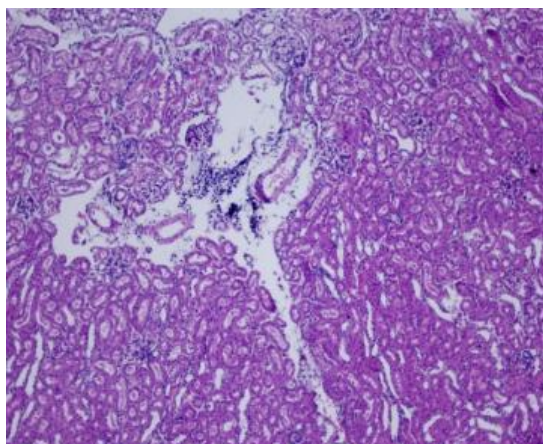
(a) Grupo de ratones macho con la cantidad administrada de 2000 mg/kg. Parénquima hepático con pocos linfocitos alrededor de la vena central.

(b) Grupo de ratones hembra con la dosificación de 2000 mg/kg. Parénquima hepático con linfocitos lobulillares aislados (inflamación lobulillar leve).

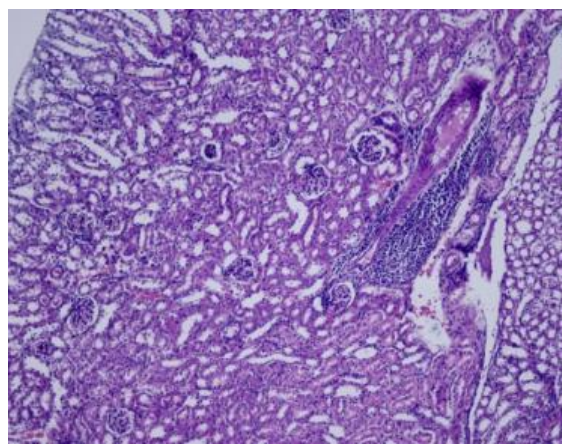
(c) Grupo de ratones macho con a la dosis de 5000 mg/kg. Parénquima hepático con linfocitos lobulillares aislados (inflamación lobulillar leve).

(d) Grupo de ratones hembra con la dosis de 5000 mg/kg. Parénquima hepático con linfocitos lobulillares aislados (inflamación lobulillar leve).

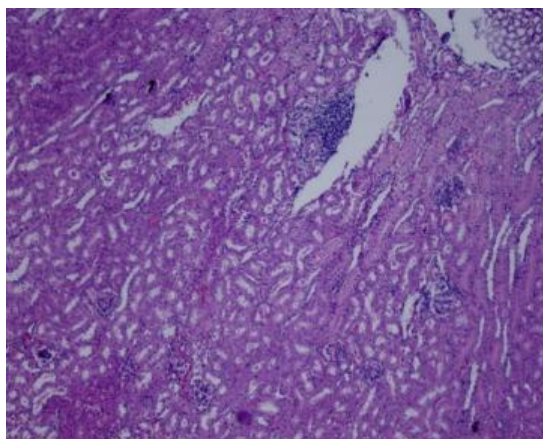
Toda esta evaluación se siguió de acuerdo con la directriz de la OCDE N° 420, clasificando el producto como tóxico categoría B (toxicidad evidente y / o ≤ 1 muerte), utilizando la dosis más alta por seguridad y bienestar animal para limitar el número de animales, por lo tanto, el uso de dosis más bajas se restringió. En otros órganos, como el cerebro, el bazo, el estómago, el corazón y los testículos, no se observó daño tóxico (Figura 11).



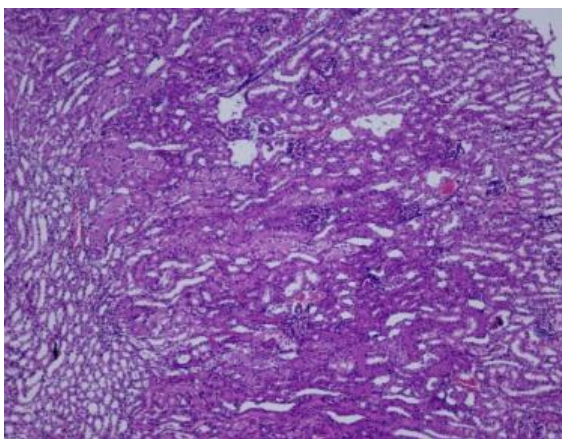
(a)



(b)



(c)



(d)

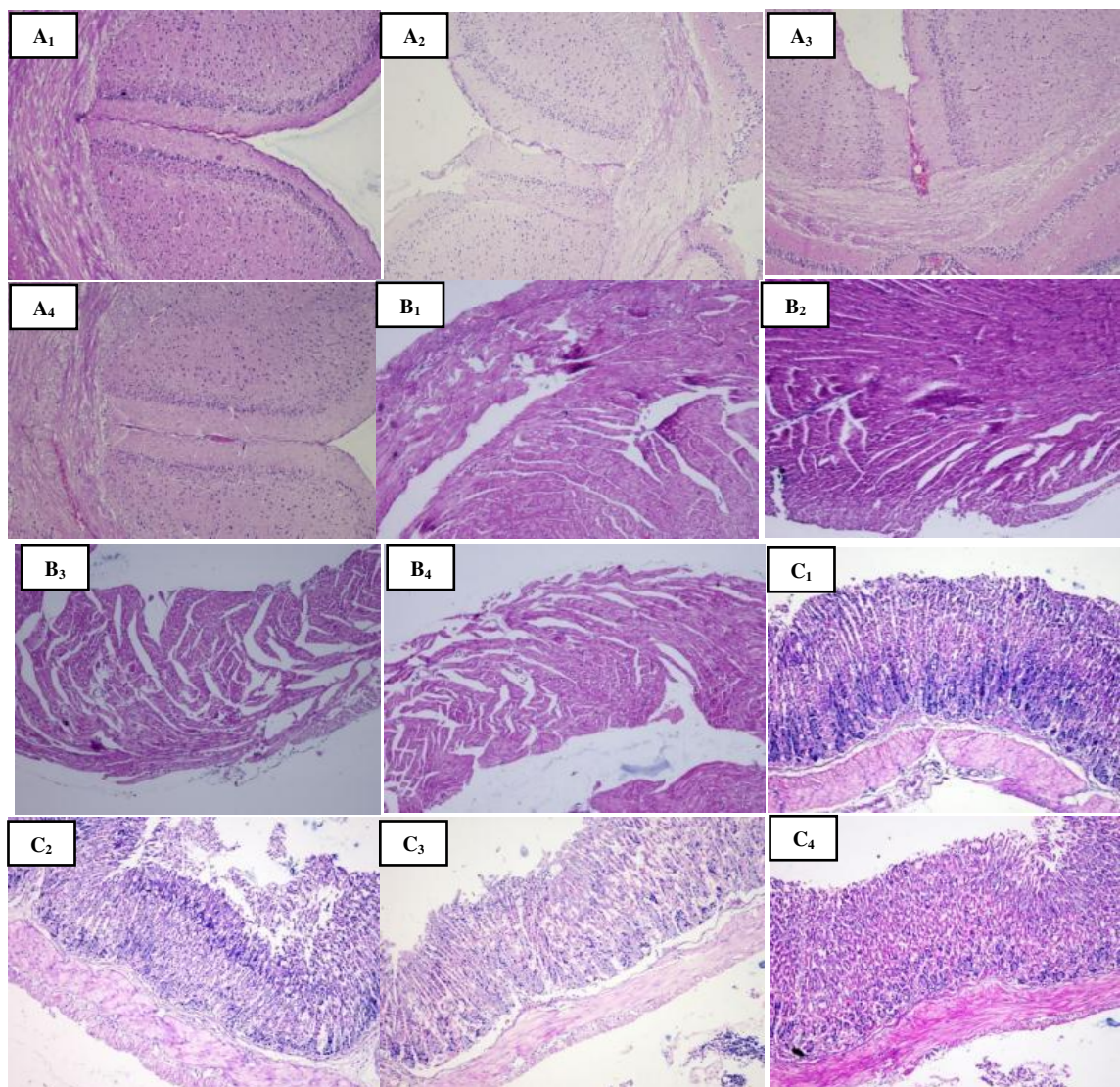
Figura 10. Microfotografías del tejido renal de ratones macho y hembra que recibieron dosis fija de 2000 mg/kg y 5000 mg/kg de harina de *tocosh*. (Tinción con H&E, 200X).

(a) Grupo de ratones macho con la cantidad administrada de 2000 mg/kg. Parénquima renal con infiltrado inflamatorio intersticial crónico aislado.

(b) Grupo de ratones hembra en la dosificación de 2000 mg/kg. Parénquima renal y leve infiltrado inflamatorio intersticial crónico con tendencia a la acumulación linfoide.

(c) Grupo de ratones macho con la dosis de 5000 mg/kg. Parénquima renal con leve infiltrado inflamatorio intersticial crónico con tendencia a la formación de acúmulos linfoides.

(d) Grupo de ratones hembra con la dosis de 5000 mg/kg. Parénquima renal con infiltrado inflamatorio intersticial crónico aislado.



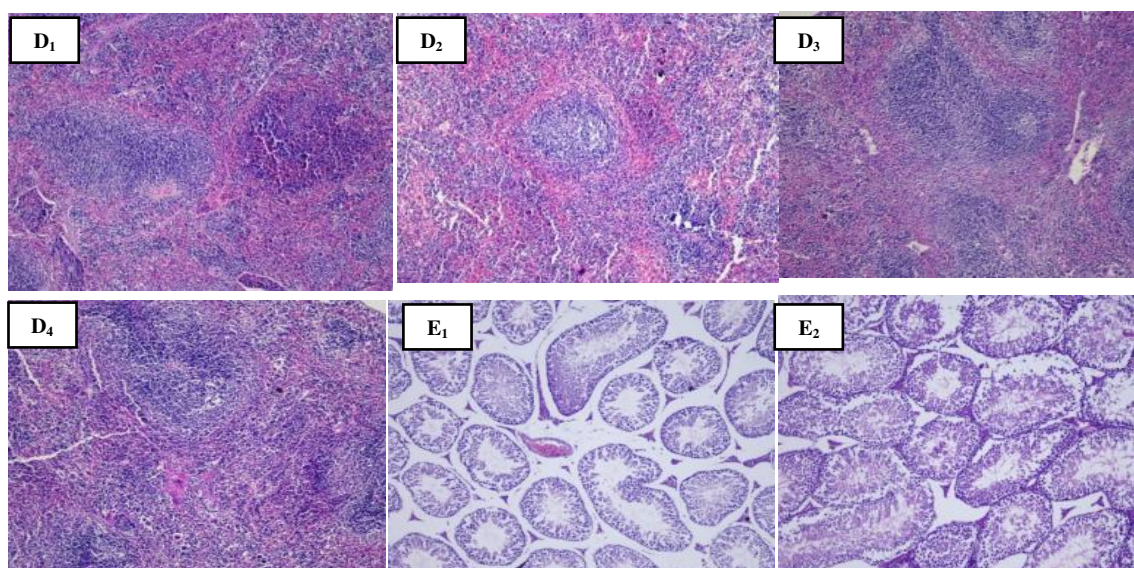


Figura 11. Microfotografías de tejidos de ratones macho y hembra sin alteraciones significativas que recibieron dosis fija de 2000 mg/kg y 5000 mg/kg de solución de harina de *tocosh*. Tinción H&E y 40X

A₁. Ratón macho con dosificación de 2000 mg/kg. Cerebro – Parénquima cerebral sin alteraciones significativas.

A₂. Ratón hembra con dosificación de 2000 mg/kg. Cerebro – Parénquima cerebral sin alteraciones significativas.

A₃. Ratón macho con dosificación de 5000 mg/kg. Cerebro – Parénquima cerebral sin alteraciones significativas.

A₄. Ratón hembra con dosificación de 5000 mg/kg. Cerebro – Parénquima cerebral sin alteraciones significativas.

B₁. Ratón macho con dosificación de 2000 mg/kg. Corazón – Miocardio sin alteraciones significativas.

B₂. Ratón hembra con dosificación de 2000 mg/kg. Corazón – Miocardio sin alteraciones significativas.

B₃. Ratón macho con dosificación de 5000 mg/kg. Corazón – Miocardio sin alteraciones significativas.

B₄. Ratón hembra con dosificación de 5000 mg/kg. Corazón – Miocardio sin alteraciones significativas.

C₁. Ratón macho con dosificación de 2000 mg/kg. Estómago – Mucosa gástrica sin alteraciones significativas.

C₂. Ratón hembra con dosificación de 2000 mg/kg. Estómago – Mucosa gástrica sin alteraciones significativas.

C₃. Ratón macho con dosificación de 5000 mg/kg. Estómago – Mucosa gástrica sin alteraciones significativas.

C₄. Ratón hembra con dosificación de 5000 mg/kg. Estómago – Mucosa gástrica sin alteraciones significativas.

D₁. Ratón macho con dosificación de 2000 mg/kg. Bazo – Parénquima esplénico sin alteraciones significativas.

D₂. Ratón hembra con dosificación de 2000 mg/kg. Bazo – Parénquima esplénico sin alteraciones significativas.

D₃. Ratón macho con dosificación de 5000 mg/kg. Bazo – Parénquima esplénico sin alteraciones significativas.

D₄. Ratón hembra con dosificación de 5000 mg/kg. Bazo – Parénquima esplénico sin alteraciones significativas.

E₁. Ratón macho con dosificación de 2000 mg/kg. Testículo – Parénquima testicular sin alteraciones significativas.

E₂. Ratón macho con dosificación de 5000 mg/kg. Testículo – Parénquima testicular sin alteraciones significativas.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

Los glicoalcaloides de la “papa” como la α -solanina, la α -chaconina y la solanidina tienen una función especial como defensa natural contra las plagas y su consumo puede resultar en diferentes síntomas que pueden incluir, diarrea, fiebre, náuseas e incluso la muerte ^{53, 54}. El principal mecanismo estudiado de este tipo de alcaloides está relacionado con un efecto inhibitor sobre las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) ^{55, 56}. Además, es de importante conocimiento que los glicoalcaloides interfieren con el transporte de iones en las membranas celulares, modificando el potencial de acción a nivel de la célula. La Comisión Europea, basándose en estudios toxicológicos, decidió que el contenido total de glicoalcaloides no debe exceder el límite de 150 mg/kg de “papa” en harina para aplicaciones alimentarias ⁵⁷.

El *tocosh* de la “papa” proviene de un proceso de fermentación (técnica andina), el cual es apto para su posterior distribución y consumo en los diferentes mercados del Perú, tanto como en su forma de harina o como en su estado crudo. Por otra parte, la cantidad de glicoalcaloides están relacionadas con el método de cultivo, almacenamiento y temperatura, dependiendo en general de las técnicas andinas destinadas a su producción y pueden distribuirse en diferentes partes del tubérculo de *Solanum tuberosum*, que según estudios estos glicoalcaloides se han encontrado en el tubérculo (menor cantidad), hojas y cáscara (mayor cantidad), y algunos análisis mostraron cantidades como 300 a 600 mg/kg en cáscara, 2000-4000 mg/kg en yemas y 3000 hasta 5000 mg/kg en flores ⁵⁸.

En el presente trabajo de investigación, se identificó los constituyentes fitoquímicos del *tocosh* de “papa”, encontrándose grupos aminos libres, taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides, Triterpeno, esteroides y saponinas, utilizando la metodología de Lock de Ugaz, (2016). De igual forma se determinó la presencia del alcaloide α -solanina por el método de GC/MS, en comparación con base de estudios de esta especie vegetal *Solanum tuberosum*, sus glicoalcaloides conocidos como son la α -solanina, α -chaconina y solanidina representan los marcadores fitoquímicos de la especie ^{53, 54}. Sin embargo en nuestro estudio solo se logró identificar un solo alcaloide, tratándose de un producto que ha sufrido modificaciones durante la fermentación, es posible que la variación de los componentes iniciales en el día cero de la fermentación hayan

producido otros compuestos no detectados en el análisis según la metodología adoptada en el mes seis de colecta del *tocosh*. Además, esto puede ser variable debido al proceso de fermentación, condiciones climáticas y de almacenamiento que se debe priorizar para ser estudiados por las variedades distintas de este tubérculo que existen hoy en día y los diferentes climas que presenta nuestro país, por lo que también deriva la generación de constituyentes fitoquímicos identificados, y otras especies de bacterias como los lactobacillus que no se identificó pero que podrían haberse generado durante el proceso de fermentación. Es importante mencionar que la harina de *tocosh* de “papa” es un excelente aditivo alimentario que podría añadirse a pasteles, espesantes, alimentos para el desayuno, condimentos y otros ⁵⁹.

Actualmente, no existen datos sobre intoxicaciones graves en la población, que consume harina de *tocosh* como tratamiento tradicional alternativo para enfermedades digestivas y respiratorias. En cuanto al estudio de toxicidad oral a la dosis repetida por 28 días (OECD N° 407), se utilizó la dosis máxima de 1000 mg/kg en ratas, observándose un aumento en el peso corporal de las mismas. Esto podría explicarse, debido a que los animales están siendo alimentados con la harina de *tocosh* que, al contener un alto contenido de carbohidratos, aumenta el peso corporal en los animales de experimentación utilizados en los ensayos. Sin embargo, el aumento de peso corporal difiere de otros estudios donde los ratones alimentados durante 7 días con 2130 mg/kg y 2170 mg/kg de alcaloides de “papa” expresados como α -chaconina y α -solanina respectivamente, mostraron una disminución en el peso corporal y de manera similar una disminución del peso relativo en órganos como el hígado, el cual se administraron alcaloides como la α -solasodina y solanidina durante 14 días ^{60, 61}.

Los aumentos significativos en el peso del hígado se asocian comúnmente con cambios adaptativos como la acumulación de lípidos, glucógeno u otras sustancias o como resultado del daño celular, congestión, hipertrofia o hiperplasia hepatocelular ^{62, 63}. Esta variación no siempre se correlaciona con la cantidad de inducción de enzimas hepáticas en ratas como aspartato amino transferasa (AST) y alanino amino transferasa (ALT) ⁶⁴. En nuestros hallazgos trabajados con ratas, no observamos ningún tipo de daño en los tejidos hepáticos analizados mediante el microscopio, ni alguna alteración de las enzimas hepáticas. Esta investigación reveló que la presencia de cualquier grupo

fitoquímico encontrado en la harina de *tocosh* no alteró la histología en ratas a la dosis repetida de 1000 mg/kg de peso corporal durante 28 días.

En el examen hematológico, no hubo diferencias significativas entre las ratas a las que se les administró harina de *tocosh* y el grupo control. El análisis bioquímico de colesterol *LDL* mostró un aumento significativo en ratas de ambos sexos, de manera similar, hubo una disminución significativa de triglicéridos en ratas macho pero no en ratas hembra. Estos hallazgos podrían verse alterados debido al almidón de la “papa”, que se encuentra más en estado fosforilado que en otros almidones de cereales ⁶⁵, y los polisacáridos no digeridos promueven la excreción de ácidos biliares produciendo una reducción de los niveles de triglicéridos. Sin embargo, un aumento en los niveles de colesterol *LDL* podría estar relacionado con el consumo de carbohidratos ⁶⁶, y por lo tanto en la producción de colesterol *LDL*. No se dispuso de datos de control históricos sobre los valores bioquímicos o hematológicos del proveedor de animales para su comparación; por lo tanto, es posible que los parámetros anotados modificados estadísticamente estuvieran dentro del rango normal de valores de parámetros promedio.

En el estudio de toxicidad aguda del procedimiento a dosis fija según OCED N° 420, se observaron cambios menores en hígado y riñón de ratones con dosis de 2000 y 5000 mg/kg de peso corporal que se administró una sola dosis harina de *tocosh*, probablemente atribuida a su contenido de alcaloides y otros componentes determinados en este estudio. Se sabe que *Solanum tuberosum* tiene glicoalcaloides como α -chaconina y α -solanina, principalmente en el tubérculo de casi 95 %, también contiene β -solanina, β -chaconina, γ -solanina, γ -chaconina, α -solamargina y β -solamargina, pero en menor cantidad ^{60, 67}. Estos hallazgos lo relacionaríamos a la presencia del alcaloide solanina identificado por GC/MS en la fracción alcaloidal de la muestra, sin embargo, también podría deberse a otros componentes identificados en el *tocosh* mediante el screening fitoquímico preliminar.

El comité mixto de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura y la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) de Expertos en aditivos alimentarios (JECFA) considera inocuas las cantidades de glicoalcaloides entre 20 y 100 mg/kg ⁶⁸. La dosis tóxica en la población corresponde a niveles superiores a 100 mg de glicoalcaloides totales/kg de “papa” pero este valor podría verse influenciado por las

condiciones ambientales y de almacenamiento ^{69, 70, 71}. Por otro lado, en la administración de 1,25 mg de glicoalcaloides totales / kg de peso corporal, considerada la dosis más alta en los seres humanos, se registraron signos gastrointestinales como vómitos en 4 h ^{72, 73}. Los alcaloides de la “papa” en cantidad administrada a 75 mg/kg de α -chaconina y α -solanina fueron letalmente mortales en 4 a 5 días en los animales como el hámster dorado sirio ⁷⁴. Estudios realizados en porcinas hembras demuestran que la α -Solanina (10 uM) durante la maduración *in vitro* de ovocitos (MIV) afectan de forma negativa la formación inicial del embrión del porcino al inhibir la formación de blastocistos y minimizar la calidad del embrión ⁷⁵. En otro estudio se comprobó que los efectos tóxicos y citotóxicos de la α -solanina que se encuentran en la “papa” alteran la proliferación y el funcionamiento de las células testiculares en ratones al regular las células de Sertoli y Leydig, afectando los testículos y la función reproductora de los ratones macho ⁷⁶. Asimismo, la α -solanina y la α -chaconina en concentraciones micromolares causan un efecto citotóxico sobre las células de glioma de rata C6 a nivel de la membrana plasmática ⁷⁷. A pesar de los estudios ya demostrados por los efectos directos de los glicoalcaloides en diferentes órganos, en nuestro estudio histopatológico no observamos alteraciones importantes en el ensayo a dosis repetidas y en ratones a dosis única.

Actualmente, no se tiene reportes de estudios toxicológicos de la harina de *tocosh*, es importante mencionar que dentro de algunos alcaloides de la “papa” como la solanidina, éste presenta rápida absorción y podría deberse a su pequeño peso molecular y estructura química no glicosilada. En otros estudios con animales, se ha demostrado que los glicoalcaloides administrados por vía oral son menos tóxicos que la administración por vía intraperitoneal (I.P.) debido a la mala absorción en el intestino. En animales de experimentación como en ratones, la Dosis Letal 50 (DL50) por vía Intraperitoneal es de 23 mg/kg, 34 mg/kg y 500 mg/kg para chaconina, solanina y solanidina respectivamente, y más de 1000 mg/kg para α -solanina por vía oral ⁷⁸.

Por otro lado, el nivel del efecto adverso no observado (NOAEL) en ratas para la harina de *tocosh* fue de 1000 mg/kg, estimando la dosificación equivalente a la humana (HED) ⁷⁹, correspondería una dosis de 1000 mg como dosis inicial en humanos con 60 kg de peso corporal. Según el consumo tradicional de *tocosh*, esta dosis es menor que la dosis consumida por la población. Aunque, parece ser seguro en comparación con la dosis

límite de glicoalcaloides que se encuentran en los tubérculos de “papa”. Sin embargo, el *tocosh* se puede consumir en dosis establecidas hasta una cantidad de 1000 mg al día de acuerdo con nuestro estudio.

Dentro de las principales limitaciones de nuestro estudio, estuvo la no determinación de los demás metabolitos secundarios por metodologías más específicas, es decir con sus respectivas identificaciones de estructuras químicas presentes en el *tocosh* de “papa”, para establecer una relación y análisis de la actividad tóxica con las alteraciones a nivel histológicos presentadas en los ratones a la dosis única, por lo que no se descarta el hecho que debido al estado de almacenamiento y putrefacción de este producto por espacio mínimo de 6 meses pudieron haberse desnaturalizado algunos metabolitos o crearse otros que no se determinó.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

- La fracción alcaloidal del *tocosh* de papa presentó como único alcaloide identificado la α -solanina y en el estudio toxicológico del *tocosh* administrado por vía oral a la dosis de 2000 mg/kg y 5000 mg/kg de peso corporal en dosis única produjo leves alteraciones histopatológicas a nivel del hígado y riñón según el examen anatomopatológico.
- Se identificaron los constituyentes fitoquímicos por análisis cualitativo preliminar (*screening* fitoquímico) en el *tocosh* de “papa” como son los grupos de aminos libres, taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides, triterpeno, esteroides, y saponinas.
- Mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS) se determinó un alcaloide esteroideal denominado α -solanina presente en la fracción alcaloidal del *tocosh* de “papa”.
- En las evaluaciones toxicológicas a nivel preclínico, se realizaron dos ensayos utilizando los protocolos de la OECD, en el cual la administración del *tocosh* de “papa”, no presentó toxicidad en la dosis de 1000 mg/kg/día, en el ensayo de dosis repetidas por 28 días en ratas macho y hembra considerando esta dosis como la más alta por criterios de seguridad animal, siendo este valor la dosis sin efecto adverso (NOAEL), garantizando su seguridad a nivel preclínico mediante el método de la OECD N° 407. Así también por el método de la OECD N° 420 (toxicidad aguda a dosis única), se determinó que la dosis letal 50 (DL50) del *tocosh* de “papa” es superior a 2000 mg/kg, pero inferior a 5000 mg/kg en ratones BALB/C, clasificándose el producto (*tocosh* de “papa”) como tóxico categoría B (toxicidad evidente y / o ≤ 1 muerte).

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hardigan MA, Laimbeer FPE, Newton L, Crisovan E, Hamilton JP, Vaillancourt B, et al. Genome diversity of tuber-bearing solanum uncovers complex evolutionary history and targets of domestication in the cultivated potato. *Proc Natl Acad Sci*. 2017; 114(46): E9999 - E10008.
2. Berdugo-Cely J, Valbuena RI, Sánchez-Betancourt E, Barrero LS, Yockteng R. Genetic diversity and association mapping in the colombian central collection of solanum tuberosum L. Andigenum group using SNPs markers. *PLoS One*. 2017; 12(3): e0173039.
3. Velásquez-Milla D, Casas A, Torres-Guevara J, Cruz-Soriano A. Ecological and socio-cultural factors influencing in situ conservation of crop diversity by traditional andean households in Peru. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2011; 7(1): 40.
4. Velasco-Chong JR, Herrera-Calderón O, Rojas-Armas JP, Hañari-Quispe RD, Figueroa-Salvador L, Peña-Rojas G, et al. TOCOSH FLOUR (*Solanum tuberosum* L.): A Toxicological Assessment of Traditional Peruvian Fermented Potatoes. *Foods* 2020; 9 (6): 719.
5. Mayta-Tovalino F, Sedano-Balbin G, Romero-Tapia P, Alvítez-Temoche D, Álvarez-Paucar M, Gálvez-Calla L, Sacsquispe-Contreras S. Development of new experimental dentifrice of peruvian solanum tuberosum (Tocosh) fermented by water stress: Antibacterial and cytotoxic activity. *J Contemp Dent Pract*. 2019; 20(10): 1206 – 1211.
6. Mosso AL, Jimenez ME, Vignolo G, LeBlanc JG., Samman NC. Increasing the folate content of tuber based foods using potentially probiotic lactic acid bacteria. *Food Res Int*. 2018; 109: 168 - 174.
7. Leblanc JGJ, Vignolo GM, Todorov SD, Savoy G. Indigenous fermented foods and beverages produced in Latin America. In *Food Intake: Regulation, Assessing and Controlling*; Nova Science Publishers, Inc.: Hauppauge, NY, USA, 2013: 35 - 58.

8. Langkilde S, Mandimika T, Schrøder M, Meyer O, Slob W, Peijnenburg A, Poulsen M. A 28-day repeat dose toxicity study of steroidal glycoalkaloids, α -solanine and α -chaconine in the Syrian Golden hamster. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47(6): 1099 – 1108.
9. Barceloux DG. Potatoes, Tomatoes, and Solanine Toxicity (*Solanum tuberosum* L., *Solanum lycopersicum* L.). *Dis Mon.* 2009; 55(6): 391–402.
10. Friedman M. Potato glycoalkaloids and metabolites: Roles in the plant and in the diet. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(23): 8655–8681.
11. Chen Z, Miller AR. Steroidal alkaloids in solanaceous vegetable crops. *Hortic Rev.* 2010; 171–196.
12. Ochola J, Cortada L, Ng'ang'a M, Hassanali A, Coyne D, Torto B. Mediation of Potato–Potato Cyst Nematode, *G. rostochiensis* Interaction by Specific Root Exudate Compounds. *Front Plant Sci.* 2020; 11: 649.
13. Romanucci V, Di Fabio G, Di Marino C, Davinelli S, Scapagnini G, Zarrelli, A. Evaluation of new strategies to reduce the total content of α -solanine and α -chaconine in potatoes. *Phytochem Lett.* 2018; 23: 116–119.
14. Küster N, Rosahl S, Dräger B. Potato plants with genetically engineered tropane alkaloid precursors. *Planta.* 2016; 245(2): 355–365.
15. Hossain MB, Brunton NP, Rai DK. Effect of Drying Methods on the Steroidal Alkaloid Content of Potato Peels, Shoots and Berries. *Molecules* 2016, 21(4), 403.
16. Cárdenas PD, Sonawane PD, Heinig U, Bocobza SE, Burdman S, Aharoni A. The bitter side of the nightshades: Genomics drives discovery in Solanaceae steroidal alkaloid metabolism. *Phytochemistry*, 2015; 113: 24–32.
17. Hossain, MB, Rawson A, Aguiló-Aguayo I, Brunton N P, Rai DK. Recovery of Steroidal Alkaloids from Potato Peels Using Pressurized Liquid Extraction. *Molecules*, 2015; 20(5): 8560–8573.

18. Hossain MB, Rai DK, Brunton NP. Optimization and validation of ultra-high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometry method for qualitative and quantitative analysis of potato steroidal alkaloids. *J Chromatogr B*, 2015; 997: 110–115.

19. Vilca L. Evaluación de la concentración de penicillium en el tocosh de papa (*Solanum tuberosum* L.) de la variedad yungay en diferentes tiempos de fermentación. [Tesis para optar el Título profesional de Ingeniero Agroindustrial]. Huancavelica – Perú. Universidad Nacional de Huancavelica. 2014.

20. Enciso S, Medina J, Mauricio F, Mauricio-Vilchez C, Alvitez-Temoche D, Vilchez L, et al. Antibacterial Effectiveness of Four Concentrations of the Hydroalcoholic Extract of *Solanum tuberosum* (Tocosh) against *Streptococcus mutans* ATCC 25175TM: A Comparative *In Vitro* Study. *Int J Dent*. 2020; 2020: 1–5.

21. Mayta-Tovalino F, Sedano-Balbín G, Romero-Tapia P, Alvítez-Temoche D, Álvarez-Paucar M, Gálvez-Calla L, et al. Development of New Experimental Dentifrice of Peruvian *Solanum tuberosum* (Tocosh) Fermented by Water Stress: Antibacterial and Cytotoxic Activity. *J Contemp Dent Pract*. 2019; 20(10): 1206-1211.

22. Enciso S. Actividad antibacteriana del extracto de *Solanum tuberosum* “tocosh” y clorhexidina al 0.12 % sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. *in vitro*. [Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista]. Lima – Perú. Universidad Nacional Federico Villareal. 2019.

23. Carranza R, Huamanchaqui A. Efecto cicatrizante de una crema a base de *solanum tuberosum* (tocosh) y membrana testácea de huevo de gallina en ratones albinos con lesiones por heridas punzo cortantes. [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico Y Bioquímico]. Lima – Perú. Universidad Inca Garcilaso de la Vega. 2018.

24. Arratea B, Mamani Y. Actividad antibacteriana del extracto acuoso *Solanum tuberosum* (papa fermentada) y aceite esencial *Thymus vulgaris* (tomillo), frente a cepa *Staphylococcus aureus*, estudio in vitro. [Tesis para optar el Título profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico]. Lima – Perú. Universidad Inca Garcilaso de la Vega. 2017.
25. Jiménez E, Yépez A, Pérez-Cataluña A, Ramos E, Zúñiga D, Vignolo G, et al. Exploring diversity and biotechnological potential of lactic acid bacteria from tocosh - traditional Peruvian fermented potatoes - by high throughput sequencing (HTS) and culturing. LWT - Food Sci Technol. 2018; 87: 567–574.
26. Loli R, Sandoval M, Callohuari R, Mundaca L. Tratamiento regenerativo de la mucosa gástrica con la mazamorra de tocosh de papa, en animales de experimentación. Theorēma. 2016; 3(4): 91 - 97.
27. Sandoval M. Tenorio J. Tinco A. Loli R. Calderón S. Efecto antioxidante y citoprotector del tocosh de *Solanum tuberosum* papa en la mucosa gástrica de animales de experimentación. An Fac med. 2015; 76(1):15-20.
28. López Y. Efecto inhibitorio in vitro de *Solanum tuberosum* (papa fermentada) comparado con vancomicina y oxacilina sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. [Tesis para optar el Título de Médico Cirujano]. Trujillo – Perú. Universidad Privada Antenor Orrego. 2017.
29. Escudero L, Alvarez P. Efecto gastroprotector del extracto acuoso del tocosh de *Solanum tuberosum* en úlceras gástricas en ratas albinas. [Tesis para optar el título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico]. Lima – Perú. Universidad Inca Garcilaso de la Vega. 2018.
30. Fries AM, Tapia ME. Guía de campo de los cultivos andinos. FAO, ANPE-PERÚ, 2007.
31. Román M, Rivera C, Orbegoza J, Serna F, Gamboa S, Perez W, et al. Resistencia a *Phytophthora infestans* linaje clonal EC-1 en *Solanum tuberosum* mediante la introducción del gen RB. Rev Peru Biol. 2015; 22(1): 63 – 70

32. Alor N. Caracterización de *Phytophthora infestans* y mejora genética para la resistencia en patata. [Tesis para optar el grado de Doctor]. Universitat de Lleida. 2015.
33. André CM, Oufir M, Hoffmann L, Hausman JF, Rogez H, Larondelle Y, Evers D. Influence of environment and genotype on polyphenol compounds and in vitro antioxidant capacity of native Andean potatoes (*Solanum tuberosum* L.). J Food Compost Anal. 2009; 22(6): 517–524.
34. Sevilla A. Evaluación de componentes de resistencia genética de papa (*Solanum tuberosum*) al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en condiciones controladas [Trabajo de titulación para optar el Título de Ingeniería Agroindustrial y de Alimentos]. Quito – Ecuador. Universidad de las Américas. 2018.
35. Pumisacho M, Sherwood S. El cultivo de la papa en Ecuador. INIAP-CIP. Ecuador: Editorial Abya Yala; 2002.
36. Román M, Hurtado G. Guía técnica Cultivo de la Papa. San Salvador: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal CENTA. 2002.
37. Huaman Z, Spooner DM. Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* sect. *Petota*). Am J Bot. 2002; 89(6): 947–965.
38. Taylor MA, McDougall GJ, Stewart D. Potato Flavour and Texture. Potato Biology and Biotechnology. 2007: 525-540.
39. Cerrón F. Atributos sensoriales de la papa nativa (*Solanum tuberosum* L.) después de almacenamiento en frío y cocción acuosa. [Tesis para optar el Grado de Magister en Ciencias de Tecnología de Alimentos]. Lima – Perú. Universidad Agraria la Molina. 2018.
40. Rodríguez L. Teorías sobre la clasificación taxonómica de las papas cultivadas (*Solanum* L. sect. *Petota* Dumort.). Una revisión. Agron Colomb. 2009; 27(3): 305-312.

41. Akyol H, Riciputi Y, Capanoglu E., Caboni MF, Verardo V. Phenolic Compounds in the Potato and Its Byproducts: An Overview, *Int J Mol Sci.* 2016; 17(6): 835.
42. Cerón-Lasso M, Alzate-Arbeláez AF, Rojano BA, Ñuztez-Lopez CE. Composición Fisicoquímica y Propiedades Antioxidantes de Genotipos Nativos de Papa Criolla (*Solanum tuberosum* Grupo Phureja). *Inf. Tecnol.* 2018; 29(3): 205–216.
43. Bianchi VE, Falcioni G. Reactive oxygen species, health and longevity, *AIMS Mol Sci.* 2016; 3 (4), 479-504.
44. OECD N° 407. Estudio de Toxicidad Oral por Dosis Repetida de Estudio de 28 días en roedores. 2008
45. OECD N° 420. Toxicidad Aguda Oral. Dosis Límite. 2001.
46. Google Maps. Centro Poblado Chicchuy – Distrito de Amarilis – Provincia de Huánuco - Perú. [Mapa online]. 10°00'13.0"S 76°12'17.0"W. Recuperado del URL:
<https://www.google.com/maps/place/10%C2%B000'13.0%22S+76%C2%B012'17.0%22W/@-10.0036111,-76.2069163,848m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x0:0x0!8m2!3d-10.0036111!4d-76.2047222?hl=es-ES> Consultado el 18 de agosto del 2020.
47. Lock de Ugaz, O. Investigación Fotoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Última Edición. Univ. Católica Perú, 2016.
48. Toxicología Universidad Complutense Editado por: R. Garrido-Lestanche - Impreso en España setiembre 1980.
49. Avellán M. Desarrollo de un método para la determinación de drogas de abuso por cromatografía gaseosa/espectrometría de masas en muestra de orina en pacientes que acuden al Laboratorio Toxicológico del Instituto Nacional de Investigaciones en Salud Pública (Inspi) 2014 [Tesis presentada para optar el Grado de Magister en Bioquímica Clínica]. Guayaquil – Ecuador. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas. 2015.

50. Gisbert JA. Medicina legal y Toxicología: Alcaloides. Barcelona – España: Elsevier Masson. 2004.
51. Guía de Técnicas de Análisis de Estupefacientes, Laboratorio de Estupefacientes Regional Bogotá. Marzo 2001.
52. Ingaroca S, Castro A, Ramos N. Composición química y ensayos de actividad antioxidante y del efecto fungistático sobre *Candida albicans* del aceite esencial de *Piper aduncum* L." Matico". Bol Soc Quim Peru. 2019; 85(2); 268-279.
53. Omayio DG, Abong GO, Okoth MW. A Review of Occurrence of Glycoalkaloids in Potato and Potato Products. 2016; 4(3); 195-202.
54. Romanucci V, Pisanti A, Di Fabio G, Davinelli S, Scapagnini G, Guaragna A, et al. Toxin levels in different variety of potatoes: Alarming contents of α -chaconine. Phytochem Lett. 2016; 16: 103 – 107.
55. Langkilde S, Mandimika T, Schrøder M, Meyer O, Slob W, Peijnenburg A, et al. A 28-day repeat dose toxicity study of steroidal glycoalkaloids, α -solanine and α -chaconine in the Syrian Golden hamster. Food Chem Toxicol. 2009; 47(6): 1099–1108.
56. Crawford L, Myhr BA preliminary assessment of the toxic and mutagenic potential of steroidal alkaloids in transgenic mice. Food Chem Toxicol. 1995; 33(3): 191 – 194.
57. Abduh S, Leong SY, Agyei D. Oey I. Understanding the properties of starch in potatoes (*Solanum tuberosum* var. Agria) after being treated with pulsed electric field processing. Foods. 2019; 8(5): 159.
58. Nielsen SD, Schmidt JM, Kristiansen GH, Dalsgaard TK, Larsen LB. Liquid Chromatography Mass Spectrometry Quantification of α -solanine, α -chaconine, and Solanidine in Potato Protein Isolates. Foods. 2020; 9(4): 416.

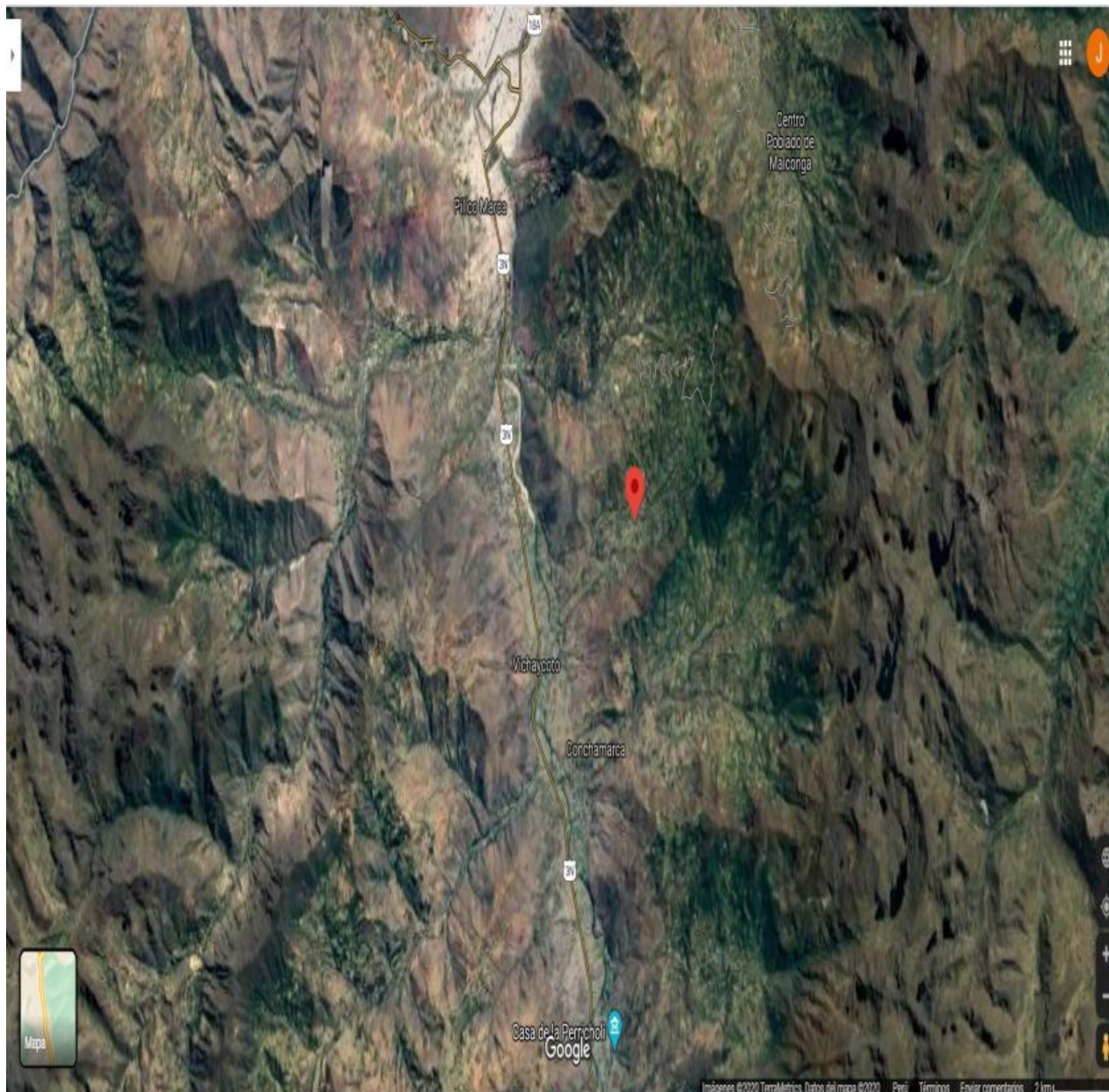
59. Cui L, Tian Y, Tian S, Wang Y, Gao F. Preparation of potato whole flour and its effects on quality of flour products: A review. *Grain & Oil Science Technology*. 2018; 1(3): 145 - 150.
60. Friedman M. Potato glycoalkaloids and metabolites: Roles in the plant and in the diet. *J Agric Food Chem*. 2006; 54(23): 8655–8681.
61. Patil BC, Sharma RP, Salunkhe DK, Salunkhe K. Evaluation of solanine toxicity. *Food Cosmet Toxicol*. 1972; 10(3): 395–398.
62. Lau JKC, Zhang X, Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J Pathol*. 2016; 241(1): 36–44.
63. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(42):5286-5296.
64. Greaves P. *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation*, 4th ed.; Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2011
65. Hashimoto N, Ito Y, Han KH, Shimada KI, Sekikawa M, Topping DL, et al. Potato pulps lowered the serum cholesterol and triglyceride levels in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2006; 52(6), 445–450.
66. Ma Y, Chiriboga DE, Olendzki BC, Li W, Leung K, Hafner AR, et al. Association between Carbohydrate Intake and Serum Lipids. *J Am Coll Nutr*. 2006; 25(2): 155–163.
67. Wang S, Panter KE, Gaffield W, Evans RC, Bunch TD. Effects of steroidal glycoalkaloids from potatoes (*Solanum tuberosum*) on in vitro bovine embryo development. *Anim Reprod Sci*. 2005; 85(3-4): 243–250.
68. Zhou X, Gao Q, Praticò G, Chen J, Dragsted LO. Biomarkers of tuber intake. *Genes Nutr*. 2019; 14(1): 9.

69. Romanucci V, Pisanti A, Di Fabio G, Davinelli S, Scapagnini G, Guaragna A, et al. Toxin levels in different variety of potatoes: Alarming contents of α -chaconine. *Phytochem Lett*. 2016; 16: 103–107.
70. Friedman M. Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *J Chromatogr A*. 2004; 1054(1-2): 143–155.
71. Friedman M, Rayburn JR, Bantle JA. Structural relationships and development toxicity of Solanum alkaloids in the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus. *J Agric Food Chem*. 1992; 40(9): 1617–1624.
72. Connors NJ, Glover RL, Stefan C, Patterson D, Wong E, Milstein M, et al. Biological and botanical confirmation of solanaceous glycoalkaloid poisoning by susumber berries (*Solanum torvum*). *Clin Toxicol*. 2014; 52(4): 389-390.
73. Nigg HN, Ramos LE, Graham EM, Sterling J, Brown S, Cornell JA. Inhibition of Human Plasma and Serum Butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) by α -Chaconine and α -Solanine. *Toxicol Sci*. 1996; 33(2), 272–281.
74. Gaffield W, Keeler R F. Induction of terata in hamsters by solanidane alkaloids derived from *Solanum tuberosum*. *Chem Res Toxicol*. 1996; 9(2): 426–433.
75. Lin T, Oqani RK, Lee JE, Kang JW, Kim SY, Cho ES, Jeong YD, Baek JJ, Jin DI. α -solanine impairs oocyte maturation and quality by inducing autophagy and apoptosis and changing histone modifications in a pig model. *Reprod Toxicol*. 2018; 75: 96 – 109.
76. Park S, Park MY, Song G, Lim W. Alpha-solanine inhibits cell proliferation via mitochondrial dysfunction and inhibin synthesis in mouse testis In vitro and In vivo. *Chemosphere*. 2019; 235: 271 – 279.
77. Yamashoji S, Matsuda, T. Synergistic cytotoxicity induced by α -solanine and α -chaconine. *Food Chem*. 2013; 141 (2): 669–674.

- 78.** Al Sinani SSS, Eltayeb EA. The steroidal glycoalkaloids solamargine and solasonine in Solanum plants. S Afr J Bot. 2017; 112: 253–269.
- 79.** Nair A, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. J Basic Clin Pharm. 2016; 7(2): 27 – 31.

CAPÍTULO VIII. ANEXOS

ANEXO 1: UBICACIÓN SATELITAL DEL CENTRO POBLADO DE CHICCHUY, DISTRITO DE AMARILIS – PROVINCIA DE HUÁNUCO.



**ANEXO 2: CONSTANCIA DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL UNMSM.
CONSTANCIA No. 038-USM-2020.**

	UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO MUSEO DE HISTORIA NATURAL	
---	---	---

"Año de la Universalización de la Salud"

CONSTANCIA N° 038-USM-2020

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa) recibida de **JONAS ROBERTO VELASCO CHONG**, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, egresado de la Maestría en Toxicología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica; ha sido estudiada y clasificada como: ***Solanum tuberosum* L. subsp. tuberosum** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de APG IV (2016).

ORDEN: SOLANALES

FAMILIA: SOLANACEAE

GENERO: *Solanum*

ESPECIE: *Solanum tuberosum* L. subsp. tuberosum

Nombre Vulgar: "papa"
Determinado por: Dr. Asunción A. Cano Echevarría

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que considere pertinente.

Lima, 03 de febrero de 2020


Dra. Joaquina Albán Castillo
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



JAC/ddb

**ANEXO 3: CERTIFICADO SANITARIO DEL INSTITUTO NACIONAL DE
SALUD.**

CERTIFICADO SANITARIO N° 230-2019

	INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS COORDINACIÓN DE BIOTERIO
CERTIFICADO SANITARIO N°	
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">230-2019</div>	
Producto : Ratón albino	Cepa : Balb/c/CNPB
Especie : <u>Mus musculus</u>	
Lote N° : M-37-2019	Cantidad : 24
Peso : Mayor a 15 a 24 g.	Sexo : Macho (12) hembras (12)
Edad : 2 meses	
Producto : Rata Albina	Cepa : Holtzman
Especie : <u>Rattus norvegicus</u>	
Lote N° : R-09-2019	Cantidad : 22
Peso : 140 a 150 g.	Sexo : Macho (11) hembras (11)
Edad : 1 mes ½	
G.R : 038003	
Fecha : 11.09.2019	Destino : Velasco Chong, Jonas
<p>El Médico Veterinario que suscribe, Arturo Rosales Fernández. Coordinador de Bioterio, CERTIFICA, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.</p> <p>* Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el Ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para animales de experimentación.</p>	
<p>Chorrillos, 11 de septiembre del 2019 (fecha de entrega)</p>	
<p>NOTA : El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.</p>	
<p align="right"> M.V. Arturo Rosales Fernández. C.M.V.P. 1586</p>	

ANEXO 4: CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN ANIMAL.

Documento No 0198 / FFB-UDI-2019.11OCT2019. Certificado en el REGISTRO No 010-CE-UDI-FFB -2



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica



UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
"AÑO DE LA LUCHA CONTRA LA CORRUPCIÓN Y LA IMPUNIDAD"

Oficio N° 0198/FFB-UDI-2019

Lima, 11 de octubre del 2019

Señor
Mg. Oscar Herrera Calderon
Presente.-

Asunto: EL QUE SE INDICA

Por medio de la presente le saludo muy cordialmente y en atención al documento de la referencia, le informo que el Proyecto de investigación titulado: **ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN ALCALOIDAL Y EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE *Solanum tuberosum* L. "TOCOSH DE PAPA" A NIVEL PRECLÍNICO**, ha sido evaluado y aprobado por el Comité de Ética de nuestra Facultad; el cual se encuentra certificado con el registro Nro. **010-CE-UDI-FFB-2019**.

Sin otro en particular, hago propicia la ocasión para expresarle los sentimientos de mi especial consideración y estima.

Atentamente,

Dra. Maria Elena Salazar Salvatierra
Directora



/Dv

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"
Ir. Puro N° 1002, Jardín Botánico - Lima 1 - Perú
Teléfonos: (511) 328-4717 / (511) 679-7000 anexo 4826 Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: decano@fb@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



ANEXO N° 5: CERTIFICADO DE ANALISIS DEL ESTANDAR.



sigma-aldrich.com
 3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sial.com
 Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
α-Solanine – from potato sprouts, ≥95%

Product Number: **S3757**
 Batch Number: **SLC82661**
 Brand: **ALDRICH**
 CAS Number: **20562-02-1**
 MDL Number: **MFCD00077873**
 Formula: **C45H73NO15**
 Formula Weight: **868.06 g/mol**
 Storage Temperature: **Store at -20 °C**
 Quality Release Date: **22 JAN 2019**



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless	Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
50 mg/mL, Pyridine		
Water (by Karl Fischer)	< 6.5 %	4.2 %
Carbon (anhydrous)	58.8 - 65.7 %	62.3 %
Nitrogen (anhydrous)	1.2 - 2.0 %	1.9 %
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Purity (TLC)	> 95 %	99 %



Carolyn Baird, Supervisor
 Quality Assurance
 St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1

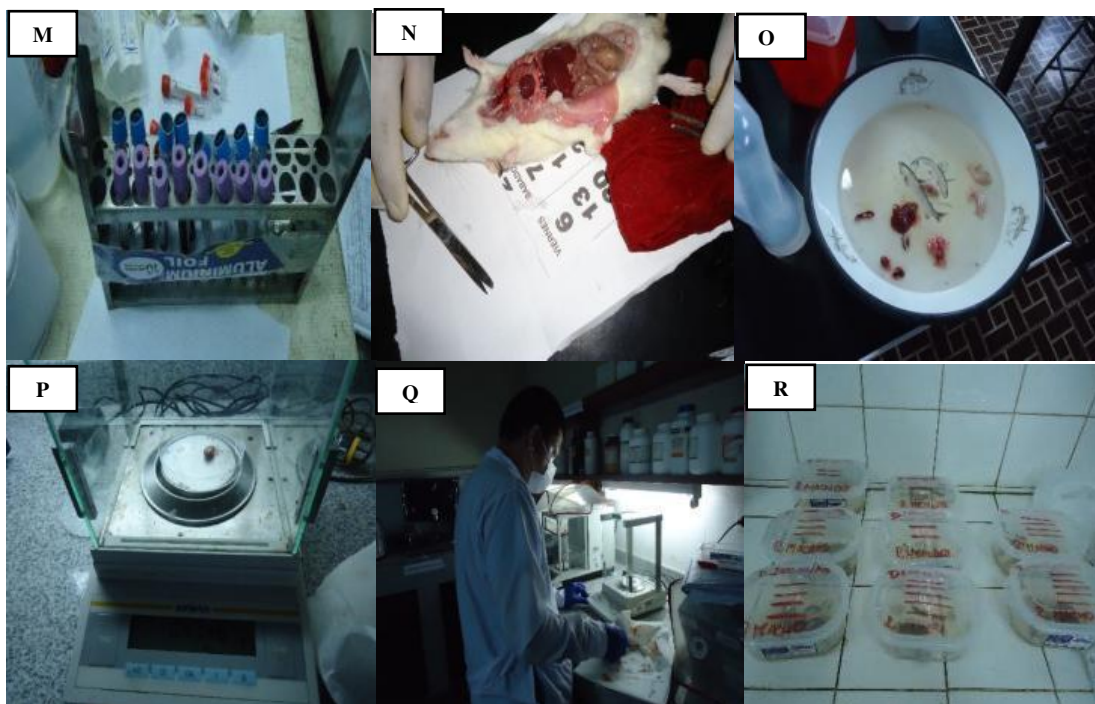
ANEXO N° 6: PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y RECOLECCIÓN DEL TOCOSH DE PAPA *Solanum tuberosum* L.



Extracción y recolección del *tocosh* de “papa” en la ciudad de Huánuco, producto medicinal y comestible que se comercializa en los mercados de la zona para su consumo en la población. El *tocosh* de “papa”, fue recolectado de la sierra del Perú en el Centro Poblado de Chicchuy. La “papa” fue deposita en el agujero de entre 50 a 70 cm de fondo, que en el término lo cubren con paja o costalillo, para protegerlo de la lluvia y de animales, se coloca piedras muy pesadas y se deja en ese lugar por un tiempo aproximadamente de seis meses a más, dependiendo del volumen y cantidad de “papa” que se utiliza y de las estaciones del año para su almacenamiento. La “papa” puede ser colocada en sombra o frente al sol, lo importante es que debe estar cerca de un tránsito de una corriente de agua o un arroyo para el proceso de humectación y putrefacción de la especie vegetal. Pasando el tiempo mínimo se saca de la zona de almacenamiento, se recolecta en recipientes y se procede a lavarlo, por lo que de esta manera ya se encuentra lista para su consumo y ser distribuidas en los mercados para su venta.

ANEXO N° 7: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL EN RATAS ALBINAS
ESPECIE *Rattus norvegicus* cepa Holtzman.



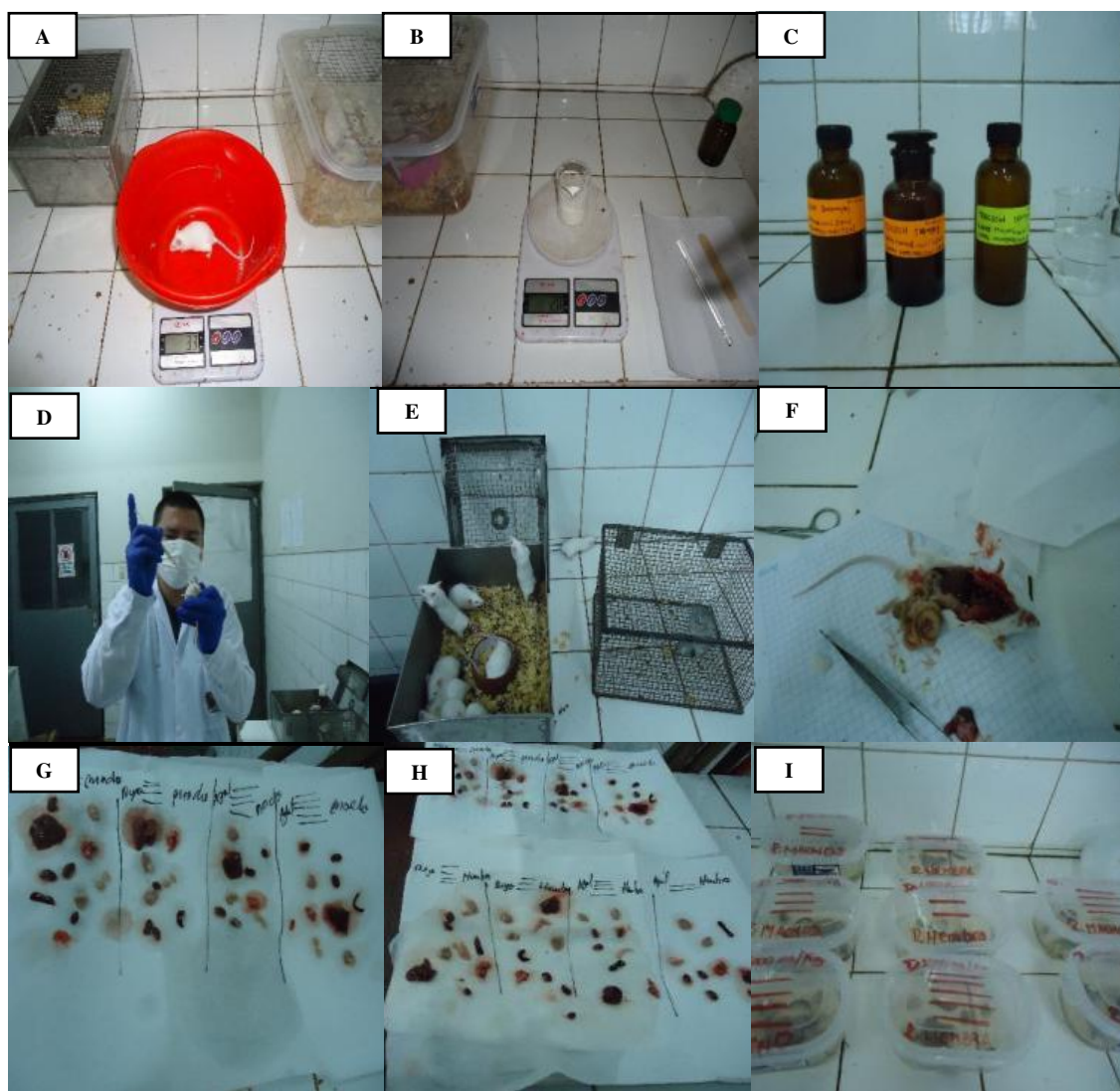


Procedimiento experimental de las ratas albinas especie *Rattus norvegicus* cepa Holtzman:

- A. Aclimatación de los animales de experimentación, para la iniciación del ensayo según protocolos de la OECD N° 407-2008.
- B. Distribución de las ratas de estudio por grupos de prueba, con el peso y edad apropiada.
- C. Clasificación de las ratas macho en dos (02) grupos (n=5), grupo control (agua destilada) y de producto (solución de harina de *tocosh* de “papa”), de igual forma con las ratas hembra fueron clasificados en dos (02) grupos (n=5).
- D. Identificación de los grupos con las marcas reconocidas según colores de identificación, marcadas en el cuerpo de los animales de experimentación.
- E. Pesaje de los animales de experimentación cada 7 días, con el propósito realizar un seguimiento en los pesos respectivos.
- F. Preparación del compuesto: solución de harina de *tocosh* de “papa”, para la administración a los grupos respectivos y al grupo control solo se administró agua destilada.
- G. Solución preparada y almacenada en refrigeración 2 °C – 8 °C en frasco ámbar, para la administración respectiva a los grupos asignados.

- H. Administración de la solución de harina *tocosh* preparada para las ratas macho y hembra de la especie *Rattus novergicus* cepa Holtzman, como grupo de ensayo.
- I. Administración de agua destilada a las ratas macho y hembra de la especie *Rattus novergicus* cepa Holtzman, como grupo control.
- J. Preparación de los animales de experimentación para ser sacrificados, y realizar las pruebas de laboratorio (sangre) y de histopatología.
- K. Anestecimiento a los animales de experimentación con éter etílico (anestésico volátil).
- L. Extracción de muestras de sangre a los animales de experimentación, para los exámenes de laboratorios (bioquímicos y hematológicos).
- M. Muestras de sangre obtenidas en tubos con y sin heparina (anticoagulante), para los exámenes de laboratorio respectivos.
- N. Necropsia a los animales de experimentación, para la extracción respectiva los órganos.
- O. Extracción de los órganos, puestos en solución de cloruro de sodio 0.9 % para evitar lisis interna y ser lavados.
- P. Pesaje de los órganos internos de los animales de experimentación.
- Q. Registro de las anotaciones del pesaje de los órganos internos, para sus comparaciones respectivas con los grupos de ensayo y control.
- R. Almacenamiento de los órganos internos, en buffer formol, por espacio de 3 días, para su conservación y fijación en la identificación posterior al microscopio.

ANEXO N° 8: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL EN RATONES ALBINOS
ESPECIE *Mus musculus* cepa BALB/c/CNPB.



Procedimiento experimental en ratones albinos utilizados en el presente ensayo:

- A. Aclimatación de los animales en la prueba, para la iniciación del ensayo según protocolos de la OECD N° 420-2001, con la distribución de los ratones de estudio según grupos de prueba, con el peso y edad apropiada. Clasificación en cuatro (04) grupos (n=5) según dosis de administración de solución de harina de *tocosh* a la cantidad de 2000 mg/kg pc y 5000 mg/kg pc. Dos grupos (02) de dosis 2000 mg/kg pc e igual de grupos para la dosis de 5000 mg/kg pc, tanto en ratones albinos macho y hembra, con la identificación de los grupos respectiva, marcadas en el cuerpo de los animales de experimentación. Y con la medición del peso respectivo al inicio y al final del ensayo

- B. Preparación del compuesto: solución de harina de *tocosh* de “papa”, para la administración a los cuatro grupos respectivos.
- C. Solución preparada y almacenada en refrigeración 2 °C – 8 °C en frasco ámbar, para la administración respectiva a los grupos asignados.
- D. Administración de la solución de harina *tocosh* preparada para los ratones albinos, en los grupos distribuidos del ensayo.
- E. Preparación de los animales de experimentación para ser sacrificados, por dislocación física y para realizar de forma posterior los exámenes macroscópicos y microscópicos.
- F. Necropsia a los animales de experimentación, para la extracción respectiva los órganos.
- G. Extracción de los órganos, puestos en solución de cloruro de sodio 0.9 %, y secados en el papel filtro.
- H. Distribución de los órganos de los animales de experimentación, después de realizar el examen macroscópico, para ser puestos en los recipientes de conservación.
- I. Almacenamiento de los órganos internos, en buffer formol, por espacio de 3 días, para su conservación y fijación en la identificación posterior al microscopio.